

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 413**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/21</b>	(2006.01)	<b>C12P 7/42</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/00</b>	(2006.01)	<b>C12P 7/44</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/02</b>	(2006.01)	<b>C12P 7/62</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/04</b>	(2006.01)		
<b>C12N 9/10</b>	(2006.01)		
<b>C12N 9/80</b>	(2006.01)		
<b>C12N 9/88</b>	(2006.01)		
<b>C12N 15/52</b>	(2006.01)		
<b>C12P 7/04</b>	(2006.01)		
<b>C12P 7/18</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2009 PCT/US2009/067943**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.06.2010 WO10068953**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2009 E 09793403 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2376622**

54 Título: **Procedimiento y composiciones ecológicas para la producción de productos químicos de poli(5HV) y de 5 carbonos**

30 Prioridad:

**12.12.2008 US 122250 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.10.2017**

73 Titular/es:

**CJ RESEARCH CENTER LLC (100.0%)  
19 Presidential Way  
Woburn, MA 01801, US**

72 Inventor/es:

**FARMER, WILLIAM R.;  
BICKMEIER, JEFF;  
LU, CHENFENG;  
CHANG, DONG-EUN;  
SKRALY, FRANK y  
RAMSEIER, THOMAS MARTIN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 639 413 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

Procedimiento y composiciones ecológicas para la producción de productos químicos de poli(5HV) y de 5 carbonos

**Descripción****Campo de la invención**

- 5 La invención se refiere, en líneas generales, a organismos transgénicos no humanos que producen polihidroxialcanoatos y copolímeros de los mismos que contienen 5-hidroxivalerato.

**Antecedentes de la invención**

10 Los polihidroxialcanoatos (PHA) son plásticos biodegradables que pueden utilizarse para fabricar, sin limitación, películas (por ejemplo, películas para envasado, películas agrícolas, películas cobertoras), soportes (tees) de golf, tapas y cierres, soportes y estacas agrícolas, recubrimientos de papel y cartón (por ejemplo, para tazas, platos, cajas, etc.), productos termoformados (por ejemplo, bandejas, recipientes, tarros de yogur, macetas, cuencos, molduras, etc.), carcacas (por ejemplo, para artículos electrónicos), bolsas (por ejemplo, bolsas de basura, bolsas para la compra, bolsas para alimentos, bolsas para abono, etc.), artículos de higiene (por ejemplo, pañales, productos de higiene femenina, productos para la incontinencia, toallitas desechables, etc.) y recubrimientos para  
15 productos granulados (por ejemplo, fertilizantes, herbicidas, pesticidas, semillas, etc., granulados).

Los PHA también se han utilizado para desarrollar dispositivos biomédicos, tales como suturas, dispositivos reparadores, parches reparadores, eslingas, parches cardiovasculares, pernos ortopédicos, barreras de adhesión, estents, dispositivos guiados de reparación/regeneración de tejido, dispositivos de reparación de cartílago articular, guías nerviosas, dispositivos de reparación de tendones, armazones de médula ósea y apósitos.

20 Los polihidroxialcanoatos pueden producirse mediante un proceso de fermentación. Los procedimientos de fermentación existentes para la producción de polihidroxialcanoatos utilizan microorganismos de tipo silvestre o transgénicos cultivados en sustratos específicos para la producción de la composición polimérica de PHA deseada. En muchos casos los polímeros de interés son copolímeros del (D)-isómero de 3-hidroxi butirato copolimerizado con uno de otros 3, 4 o 5-hidroxiácidos. Estos copolímeros se producen como inclusiones granulares dentro de las  
25 células y son copolímeros aleatorios.

El documento US 2004/033572 notifica que las composiciones poliméricas de PHA producidas utilizando sistemas biológicos, incluyen monómeros tales como 3-hidroxi butirato, 3-hidroxi propionato, 2-hidroxi butirato, 3-hidroxi valerato, 4-hidroxi butirato, 4-hidroxi valerato y 5-hidroxi valerato. Adicionalmente notifica que estas composiciones de PHA pueden extenderse para incorporar monómeros adicionales que incluyen, por ejemplo, 3-hidroxi hexanoato, 4-hidroxi hexanoato, 6-hidroxi hexanoato u otros 3-hidroxiácidos de cadena más larga que contiene siete o más átomos  
30 de carbono. Esto puede realizarse tomando productores de PHA naturales y mutando a través de mutagénesis química o basada en transposones, para eliminar o inactivar genes que codifican actividades no deseables. Como alternativa, las cepas pueden modificarse por ingeniería genética para expresar solamente aquellas enzimas necesarias para la producción de la composición polimérica deseada.

35 Desde el punto de vista industrial, el copolímero de poli(3-hidroxi butirato-co-5-hidroxi valerato) (PHB5HV) y el homopolímero de poli(5-hidroxi valerato) (P5HV) son útiles como materiales y plásticos y tienen la ventaja de ser materiales biodegradables y bioabsorbibles. Hasta ahora, estos materiales se habían producido suministrando sustratos de 5 átomos de carbono derivados de petróleo, tales como el ácido 5-hidroxi valérico (5HV) o el 1,5-pentanodiol, a un microorganismo con capacidad de metabolizar estos sustratos para dar 5HV-coenzima A monomérica activada y polimerizarlos por la acción de una PHA polimerasa para formar los polímeros PHB5HV o P5HV, los polímeros PHB5HV y P5HV producidos por estos procedimientos se obtienen, solo parcialmente, de  
40 fuentes renovables y costosas debido al alto coste de los sustratos de 5 átomos de carbono derivados de petróleo. Es muy deseable utilizar, como materia prima para la producción de polímeros PHB5HV y P5HV, sustratos de carbono renovables no derivados de petróleo, tanto a un coste más bajo como para proporcionar materiales que se obtengan completamente de fuentes renovables. También sería deseable desarrollar procedimientos para la producción de estos polímeros que reduzcan la producción de gases de invernadero. Las fuentes renovables adecuadas incluyen materias primas de hidratos de carbono disponibles de la agricultura, incluyendo una o más materias primas seleccionadas de: almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa, arabinosa y materias primas de aminoácidos, entre los que se incluyen lisina y prolina.

50 Yamanishi y col, 2007, FEBS J., 274(9): 2262-73 describen la reconstrucción de la ruta de degradación de lisina de *Pseudomonas aeruginosa*, e identificaron una supuesta 5-aminovalerato aminotransferasa (EC 2.6.1.48) y una supuesta glutarato semialdehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.20).

El documento US 2006/117401 describe un procedimiento para la producción de aminoácidos en organismos transgénicos, en particular L-metionina, en organismos transgénicos, en el que el procedimiento comprende las  
55 etapas de: a) introducir una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína degradadora de treonina y/o una proteína degradadora de lisina o b) introducir una secuencia de ácido nucleico que aumente la degradación de

treonina y/o la degradación de lisina en los organismos transgénicos y c) expresar una secuencia de ácido nucleico mencionada en (a) o (b), en el organismo transgénico.

5 Es un objeto de la invención proporcionar organismos no humanos recombinantes y procedimientos mediante los cuales puedan introducirse genes en productores de polihidroxicanoato de tipo silvestre o modificados por ingeniería genética, para crear nuevas cepas que sinteticen monómeros de 5-hidroxicanoato que se producen a partir de sustratos no derivados de petróleo.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar técnicas y procedimientos para modificar de manera estable por ingeniería genética, organismos no humanos recombinantes que sinteticen PHA que contengan 5-hidroxicanoato bien como único constituyente o como un co-monómero.

## 10 **Sumario de la invención**

### **Biopolímeros de PHA que contienen 5HV**

15 Se proporcionan hospedadores recombinantes para la producción de polihidroxicanoatos (PHA) que comprenden monómeros de 5-hidroxicanoato (5HV) y procedimientos de producción de los PHA que comprenden monómeros de 5HV a partir de sustratos de carbono renovables. En el presente documento también se describen determinados hospedadores recombinantes que producen productos químicos de 5 átomos de carbono, tales como 5-aminopentanoato (5AP), 5HV, glutarato y 1,5-pentanodiol (PDO).

20 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un organismo no humano recombinante modificado por ingeniería genética, para convertir 5-aminopentanoato en un polímero de polihidroxicanoato (PHA) o en un copolímero del mismo que comprende 5-hidroxicanoato, como se define adicionalmente en la reivindicación 1. Más preferentemente, el organismo no humano recombinante se define mediante cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

25 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, para la producción de polímeros de polihidroxicanoato (PHA) basados en 5 átomos de carbono o sus copolímeros, comprendiendo el procedimiento proporcionar lisina, u otra materia prima de carbono renovable, para modificar por ingeniería genética células de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención. Opcionalmente, la materia prima de carbono renovable se selecciona entre almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa y arabinosa, o combinaciones de las mismas; y/o el polihidroxicanoato comprende 5-hidroxicanoato, por ejemplo, poli(5-hidroxicanoato), poli(3-hidroxiacetato-co-5HV), poli(3-hidroxiacetato-co-5HV) o poli(4-hidroxiacetato-co-5HV). Opcionalmente, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de recuperar el polihidroxicanoato, el polímero o copolímero del mismo, por ejemplo, mediante tratamiento acuoso o extracción con disolventes.

30 Una realización proporciona un hospedador no humano recombinante, modificado por ingeniería genética, para convertir 5-aminopentanoato en un polímero de polihidroxicanoato (PHA) o su copolímero que comprende 5-hidroxicanoato como se define en la reivindicación 1, y la expresión de genes que codifican una polihidroxicanoato (PHA) sintasa y una 5-hidroxicanoato-CoA (5HVCoA) transferasa o 5HV-CoA sintetasa y al menos un transgén que codifica una enzima heteróloga que interviene en las rutas catabólicas de lisina en la que el hospedador produce un polímero de PHA que contiene monómeros de 5HV cuando al organismo se le proporciona un sustrato de carbono renovable seleccionado de: lisina, almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa, arabinosa o combinaciones de los mismos y el nivel de monómero de 5HV producido es mayor que en ausencia de expresión de dicho transgén o transgenes. Un hospedador ejemplar expresa uno o más genes que codifican lisina 2-monooxigenasa, 5-aminopentanamidasa, 5-aminopentanoato transaminasa, glutarato semialdehído reductasa, 5-hidroxicanoato CoA-transferasa y polihidroxicanoato sintasa, para la producción de un polímero de PHA que contiene 5 monómeros de 5HV. Preferentemente, el hospedador tiene eliminaciones o mutaciones en genes que codifican glutarato semialdehído deshidrogenasa y/o genes que codifican exportador de lisina. Los hospedadores particularmente adecuados también tienen la capacidad de sobreproducir lisina y son resistentes a análogos tóxicos de lisina, como S-(2-aminoetil) cisteína.

45 En una realización adicional uno o más de los genes que codifican PHA sintasa, 5HV-CoA transferasa o 5HV-CoA sintetasa también se expresan a partir de un transgén.

50 En otra realización al organismo no humano recombinante se le suministra lisina en combinación con uno o más sustratos de carbono renovables seleccionados de: almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa, arabinosa o combinaciones de los mismos, de tal manera que se produce el polímero de PHA que contiene 5HV y las células recuperan el polímero.

55 En otra realización al organismo no humano recombinante se le suministra uno o más sustratos de carbono renovables seleccionados de: almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa, arabinosa o combinaciones de los mismos, de tal manera que se produce el polímero de PHA que contiene 5HV y las células recuperan el polímero.

Los polímeros producidos por los hospedadores recombinantes pueden ser homopolímeros o copolímeros de

monómeros de 5HV. Un copolímero preferido es PHB5HV. Otros polímeros útiles producidos por los hospedadores recombinantes en los copolímeros poli(3-hidroxipropionato-co-5-hidroxivalerato) y poli(4-hidroxibutirato-co-5-hidroxivalerato) y el homopolímero P5HV.

5 El organismo hospedador no humano puede ser procariota o eucariota. Los hospedadores procariotas preferidos con *E. coli*, *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus* y *C. glutamicum*.

También se proporcionan hospedadores no humanos recombinantes para la producción de polímeros de PHA a partir de lisina, o de uno o más sustratos de carbono renovables, seleccionados de almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa, arabinosa o combinaciones de los mismos, de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención. Un hospedador ejemplar expresa lisina 2-monooxigenasa, 5-aminopentanamidasas, 5-aminopentanoato transaminasa, glutarato semialdehído reductasa, 5-hidroxivalerato CoA-transferasa y polihidroxialcanoato sintasa para la producción de un polímero que incluye 5HV. El polímero se produce utilizando, como materia prima, lisina y uno o más sustratos de carbono renovables, seleccionados de almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa y arabinosa. Preferentemente el hospedador tiene eliminaciones en los genes que codifican glutarato semialdehído deshidrogenasa y exportador de lisina.

### 15 **Producción de 1,5-pentanodiol**

En el presente documento también se describe otro hospedador recombinante que puede modificarse por ingeniería genética para sobreexpresar 5-hidroxivalerato CoA transferasa, propionaldehído deshidrogenasa dependiente de CoA y 1,3-propanodiol deshidrogenasa, para la producción de 1,5 pentanodiol. El 1,5 pentanodiol se produce utilizando como materia prima 5-hidroxivalerato, lisina, almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa y arabinosa en solitario o en combinaciones. Preferentemente el hospedador recombinante tiene eliminaciones en *adhE*, *ldhA*, y *ackA-pta* y expresa genes que codifican lisina 2-monooxigenasa, 5-aminopentanamidasas, 5-aminopentanoato transaminasa y una o más de glutarato o succinato semialdehído reductasa. Los hospedadores particularmente adecuados tienen la capacidad de sobreproducir lisina y de ser resistentes a análogos tóxicos de lisina, como S-(2-aminoetil) cisteína. Preferentemente, el organismo tiene una actividad glutarato semialdehído deshidrogenasa reducida o no la tiene.

En el presente documento se describe un procedimiento para la producción de 1,5-pentanodiol a partir de sustratos de carbono renovables, en el que a un organismo recombinante se le suministra un sustrato de carbono renovable y se produce 1,5-pentanodiol, que se secreta al medio y se recupera del mismo.

Por consiguiente, la presente solicitud también desvela 1,5-pentanodiol producido a partir de fuentes renovables.

### 30 **Producción de ácido glutárico**

En el presente documento también se describen hospedadores recombinantes para la sobreproducción de glutarato (ácido glutárico) a partir de lisina, o de uno o más sustratos de carbono renovables, seleccionados de almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa y arabinosa, o una combinación de los mismos. Un hospedador ejemplar expresa genes que codifican lisina 2-monooxigenasa, 5-aminopentanamidasas, 5-aminopentanoato transaminasa y uno o más de glutarato semialdehído deshidrogenasa. Los hospedadores particularmente adecuados tienen la capacidad de sobreproducir lisina y ser resistentes a análogos tóxicos de lisina, como S-(2-aminoetil) cisteína.

En el presente documento también se describe un procedimiento para la sobreproducción de glutarato a partir de sustratos de carbono renovables, en el que a un organismo recombinante se le suministra un sustrato de carbono renovable, seleccionado de lisina, almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa y arabinosa o combinaciones de los mismos y el glutarato se sobreproduce, se secreta al medio y se recupera del mismo.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra las diversas moléculas de 5 átomos de carbono que pueden producirse biológicamente a partir de fuentes renovables, en algunos casos estas moléculas basadas en fuentes renovables pueden interconvertirse utilizando química convencional y utilizarse para fabricar polímeros, etc. mediante procedimientos químicos de polimerización.

La Figura 2A es un diagrama esquemático que muestra rutas bioquímicas de polímeros de polihidroxialcanoato que contienen 5-hidroxivalerato y productos químicos de 5 átomos de carbono tales como 5-aminopentanoato (5-APO), glutarato,  $\delta$ -valerolactona (DVL) y 1,5 pentanodiol. También se muestran rutas metabólicas competidoras que han de eliminarse o las actividades reducidas (indicadas por con una cruz (X)) para obtener un flujo de carbono óptimo en los productos deseados indicados anteriormente. La Figura 2B muestra enzimas que catalizan las reacciones biosintéticas: (1) lisina 2-monooxigenasa, EC 1.13.12.2; (2) 5-aminopentanamidasas (también conocida como  $\delta$ -aminovaleramidasas), EC 3.5.1.30; (3) 5-aminopentanoato transaminasa (también conocido como  $\delta$ -aminovalerato transaminasa), EC 2.6.1.48; (4) succinato semialdehído reductasa (también conocido como 5-oxopentanoato reductasa), EC 1.1.1.61; (5) CoA-transferasa, EC 2.8.3.n; (6) Acil-CoA sintetasa, EC 6.2.1.3; (7) PHA sintasa, EC 2.3.1.n; (8)  $\beta$ -cetoacil-CoA tiasa, EC 2.3.1.9; (9) acetoacetyl-CoA reductasa, EC 1.1.1.36; (10) glutarato-semialdehído deshidrogenasa, EC 1.2.1.20.

La Figura 3 es un diagrama esquemático que muestra rutas bioquímicas de una vía alternativa desde L-lisina a 5-aminopentanoato mediante cadaverina y 5-aminopentanal.

La Figura 4 es un diagrama esquemático que muestra rutas bioquímicas desde L-prolina a 5-aminopentanoato.

5 La Figura 5 es un diagrama esquemático que muestra rutas bioquímicas desde alfa-cetoglutarato a glutarato semialdehído, un producto intermedio metabólico para la producción de 5-hidroxivalerato y sus derivados, y glutarato.

La Figura 6 es un diagrama esquemático que muestra rutas bioquímicas a partir de oxaloacetato, un producto intermedio del ciclo del ácido tricarboxílico, TCA, a L-lisina.

La Figura 7 es un diagrama esquemático que muestra rutas bioquímicas a 1,5 pentanodiol.

10 La Figura 8A es un cromatograma que muestra el tiempo (minutos) frente a la abundancia de iones total de un cultivo celular procesado de la cepa 3291. La Figura 8B es un espectro de iones de un cultivo celular procesado de la cepa 3291 que muestra la relación entre masa y carga "m/z" frente a su abundancia de iones (unidades relativas).

## **Descripción detallada de la invención**

### **I. Definiciones**

En la siguiente sección se definen y se aclaran diversos términos utilizados en el presente documento.

La expresión "copolímero de PHA" se refiere a un polímero compuesto por al menos dos monómeros de ácido hidroxialcanoico diferentes.

20 La expresión "homopolímero de PHA" se refiere a un polímero que está compuesto por un solo monómero de ácido hidroxialcanoico.

Como se usa en el presente documento, un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, un fago o un cósmido, en el cual puede insertarse otro segmento de ADN para llevar a cabo la replicación del segmento insertado. Los vectores pueden ser vectores de expresión.

25 Como se usa en el presente documento, un "vector de expresión" es un vector que incluye una o más secuencias de control de expresión.

Como se usa en el presente documento, una "secuencia de control de expresión" es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y/o traducción de otra secuencia de ADN.

30 Como se usa en el presente documento, "unido operativamente" significa incorporado en una construcción genética de tal manera que las secuencias de control de expresión controlan de un modo eficaz la expresión de una secuencia codificante de interés.

Como se usa en el presente documento, "transformado" y "transfectado" incluye la introducción de un ácido nucleico en una célula mediante diversas técnicas conocidas en la materia.

35 Como se usa en el presente documento, "sobreproducido" significa que el compuesto particular se produce a una cantidad más alta en el organismo modificado por ingeniería genética en comparación con el organismo no modificado por ingeniería genética.

Como se usa en el presente documento, todas las expresiones "materia prima renovable", "sustrato de carbono renovable" y "sustrato renovable" se usan ellas indistintamente.

Los "plásmidos" se indican con una letra minúscula "p" precedida y/o seguida por otras mayúsculas y/o números.

40 Como se usa en el presente documento, el término "heterólogo" significa de otro hospedador. El otro hospedador puede ser de la misma especie o de una especie diferente.

## **II. Rutas metabólicas para la producción de polihidroxialcanoatos y productos químicos de 5 átomos de carbono**

45 Se proporcionan organismos no humanos recombinantes que tienen enzimas para las rutas bioquímicas para la producción de polímeros de polihidroxialcanoato que contienen 5-hidroxivalerato de acuerdo con el primer y segundo aspectos de la presente invención. En el presente documento también se describen organismos no humanos recombinantes que tienen enzimas para las rutas bioquímicas para la producción de productos químicos de 5 átomos de carbono, tales como 5-aminopentanoato (5AP), 5-hidroxivalerato (5HV), glutarato y 1,5 pentanodiol (PDO). Los hospedadores procariotas o eucariotas se modifican genéticamente para expresar las enzimas necesarias para la producción de 5-hidroxivalerato, sus polímeros o los productos químicos de 5 átomos de carbono  
50 desvelados procedentes de materias primas basadas en fuentes renovables. Más adelante se proporcionan las rutas enzimáticas para la producción de los productos deseados.

### **A. 5-aminopentanoato**

El 5-aminopentanoato (5AP) puede producirse en dos etapas enzimáticas a partir de L-lisina, un  $\alpha$ -aminoácido, siendo la 5-aminopentanoamida el producto intermedio (Figura 2). La primera de estas enzimas, la lisina 2-monooxigenasa es la primera etapa enzimática en la ruta de degradación de lisina de diversas cepas de *Pseudomonas* (Takeda y Hayaishi, J. Biol. Chem. 241: 2733-2736; (1966); Hayaishi, Bacteriol. Rev. 30: 720-731 (1966); Reitz y Rodwell, J. Biol. Chem. 245: 3091-3096 (1970); Flashner y Massey, J. Biol. Chem. 249: 2579-2586 (1974)). El gen que codifica la lisina 2-monooxigenasa se identificó en *Pseudomonas putida* y se denominó *davB* (Revelles y col., J. Bacteriol. 187:7500-7510 (2005)). La segunda etapa enzimática convierte la 5-aminopentanoamida en 5AP y se cataliza mediante la 5-aminopentanoamidasa (Reitz y col., Anal. Biochem. 28: 269-272 (1969); Reitz y Rodwell, J. Biol. Chem. 245: 3091-3096 (1970)), que está codificada por *davA* en *P. putida* (Revelles y col., J. Bacteriol. 187: 7500-7510 (2005)).

Como se muestra en la Figura 3, puede utilizarse una ruta alternativa para convertir L-lisina en 5AP en tres reacciones enzimáticas que incluyen una lisina descarboxilasa para la producción de cadaverina, una putrescina transaminasa para formar 5-aminopentanal, y una  $\gamma$ -aminobutiraldehído deshidrogenasa para biosintetizar 5AP.

Como se indica en el esquema de la Figura 4, el 5AP también puede producirse a partir de L-prolina, en lugar de L-lisina, en dos reacciones enzimáticas que incluyen una prolina racemasa para biosintetizar D-prolina y una prolina reductasa para formar 5AP.

### B. 5-hidroxicetato

La biosíntesis de otro producto químico de 5 átomos de carbono, el 5HV, puede producirse a partir de 5AP con 2 etapas enzimáticas como se indica en el esquema de la Figura 2. El 5AP se convierte en glutarato semialdehído mediante la 5AP transaminasa (Reitz y Rodwell, J. Biol. Chem. 245: 3091-3096 (1970)) y se identificó un gen de *P. putida* que se denominó *davT* (Espinosa-Urgel y Ramos, Appl. Environ. Microbiol. 67: 5219-5224 (2001)). Como se indica en el Ejemplo 7, diversos genes recombinantes de semialdehído reductasa se clonaron y ensayaron para investigar qué enzima codificada convertía de un modo eficaz el glutarato semialdehído en 5HV. Se descubrió que la proteína hipotética ATEG\_00539 catalizaba de un modo eficaz esta reacción y por tanto se renombró *gsaR* por glutarato semialdehído reductasa.

En algunas bacterias termófilas y hongos inferiores, incluyendo a las levaduras, la lisina se sintetiza mediante la ruta de  $\alpha$ -aminocetoadipato (Xu, Cell Biochem. Biophys. 46: 43-64 (2006)) en la que el 2-cetoadipato es el cuarto producto intermedio y por lo tanto un posible precursor de productos químicos de C5 tales como glutarato y 5HV, así como de polímeros de PHA que contienen 5HV. Como se muestra en la Figura 5, esta ruta comienza desde  $\alpha$ -cetoglutarato y acetil-CoA para biosintetizar 2-cetoadipato. Se observó que cepas hospedadoras recombinantes de *E. coli* que expresaban estas cuatro enzimas, producían 2-cetoadipato (Andi y col., Biochem. 43: 11790-11795 (2004); Jia y col., Biochem. J. 396: 479-485 (2006); Miyazaki y col., J. Biol. Chem. 278: 1864-1871 (2003)). El 2-cetoadipato puede convertirse mediante una  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa en glutaril-CoA debido a la similitud estructural del  $\alpha$ -cetoglutarato y 2-cetoadipato. La glutaril-CoA puede convertirse mediante una semialdehído succínico (SSA) deshidrogenasa, tal como succinil-CoA sintetasa (SucD) (Söhling y Gottschalk J. Bacteriol. 178: 871-880 (1996)), de nuevo debido a la similitud estructural de la succinil-CoA y glutaril-CoA.

### C. Glutarato

La biosíntesis del producto químico de 5 átomos de carbono, glutarato, procede de glutarato semialdehído mediante una reacción deshidrogenasa (Ischihara y col., J. Biochem. (Tokio) 49: 154-157 (1961); Reitz y Rodwell, J. Biol. Chem. 245: 3091-3096 (1970)) como se indica en el esquema de la Figura 2. Se identificó el gen *davD* que codificaba dicha actividad glutarato semialdehído deshidrogenasa en *P. putida* (Espinosa-Urgel y Ramos, Appl. Environ. Microbiol. 67: 5219-5224 (2001); Revelles y col., J. Bacteriol. 186: 3439-3446 (2004)). El glutarato es útil para la producción de polímeros tales como poliésteres, poliésteres, polioles de poliéster y poliamidas. El número impar de átomos de carbono (es decir 5) es útil, por ejemplo, en la disminución de la elasticidad del polímero. Además, el 1,5-pentanodiol, es un plastificante común y precursor de poliésteres que se fabrica por hidrogenación de glutarato y sus derivados (Werle y Morawietz, "Alcohols, Polyhydric" en: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: 2002, Wiley-VCH: Weinheim. DOI 10.1002/14356007.a01\_305).

### D. poli(5-hidroxicetato)

La biosíntesis de un homopolímero que consiste en poli(5-hidroxicetato) (también conocido como P(5HV)) PHA puede proceder de 5HV mediante 5-hidroxicetato-CoA. Dos reacciones enzimáticas diferentes pueden catalizar la primera etapa, es decir, bien mediante una CoA-transferasa, como describen Huisman y col. (Patente de Estados Unidos N.º 7.229.804), Söhling y Gottschalk (J. Bacteriol. 178: 871-880 (1996)) y Eikmanns y Buckel (Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371: 1077-1082 (1990)), o mediante una CoA-sintetasa, como describen van Beilen y col. (Molec. Microbiol. 6: 3121-3136 (1992)). La polimerización de 5-hidroxicetato-CoA puede catalizarse mediante la PHA polimerasa, tal como codificarse por *phaC1* de *Ralstonia eutropha* (Peoples y Sinskey, J. Biol. Chem. 264: 15298-15303 (1989)). Como alternativa, la proteína de fusión PhaC3/C5 sintasa puede emplearse como describen Huisman y col. (Patente de Estados Unidos N.º 6.316.262).

### E. poli(3-hidroxicetato-co-5-hidroxicetato)

La biosíntesis de un copolímero que incluye poli(3-hidroxi butirato-co-5-hidroxi valerato) (también conocido como P(3HB-co-5HV)) puede producirse proporcionando 3-hidroxi butiril-CoA (3HB-CoA) y moléculas precursoras monoméricas de 5-HV-CoA. Como se indica en el esquema de la Figura 2, 3HB-CoA puede biosintetizarse a partir de acetil-CoA mediante 2 etapas enzimáticas: (i) una reacción de  $\beta$ -cetoacil-CoA tiasa que convierte acetil-CoA en acetoacetil-CoA (Nishimura y col., J. Biol. Chem, 116: 21-27 (1978)) utilizando genes adecuados tales como, pero sin limitación, *bktB* de *Ralstonia eutropha* (Slater y col., J. Bacteriol. 180(8): 1979-1987 (1998)) y (ii.) una reacción de acetoacetil-CoA reductasa que convierte acetoacetil-CoA en 3HB-CoA (Fukui y col., Biochim. Biophys. Acta 917: 365-371 (1987)) utilizando genes adecuados tales como, pero sin limitación, *phaB* de *Bacillus megaterium* (McCool y Cannon, J. Bacteriol. 181(2): 585-592 (1999)). Como se indica anteriormente, el copolímero PHA puede sintetizarse mediante diversas PHA sintasas.

#### F. Lisina

La Figura 6 indica la ruta biosintética del metabolismo de lisina en *E. coli*. Las líneas discontinuas y continuas en el centro del diagrama indican inhibición por retroalimentación alostérica y represión transcripcional por L-lisina, respectivamente, que proporcionan dianas para modificaciones genéticas necesarias para aumentar la producción de L-lisina en células hospedadoras recombinantes tales como *E. coli*.

#### G. 1,5-pentanodiol

La Figura 7 proporciona una visión general de la producción de 1,5-pentanodiol (PDO) a partir de 5HV. El 5HV puede convertirse en 5HV-CoA mediante una CoA-transferasa como describen Huisman y col. (Patente de Estados Unidos N.º 7.229.804), Söhling y Gottschalk (J. Bacteriol. 178: 871-880 (1996)), y Eikmanns y Buckel (Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371: 1077-1082 (1990)), o mediante una CoA-sintetasa como describen van Beilen y col. (Molec. Microbiol. 6:3121-3136 (1992)). El 5HV puede convertirse en 5-hidroxi pentenal mediante una propionaldehído deshidrogenasa o alcohol deshidrogenasa tal como *pduP* de *Salmonella typhimurium* (Leal, Arch. Microbiol. 180:353-361 (2003)) o *eutE* de *E. coli* (Skraly, Patente WO N.º 2004/024876). El 5-hidroxi pentenal puede convertirse en PDO mediante 1,3-propanodiol deshidrogenasa o alcohol deshidrogenasa tal como *dhaT* de *Klebsiella pneumoniae* (Tong y col., Appl. Environ. Microbiol. 57(12): 3541-3546 (1991)).

#### H. 5-hidroxi valerato-co-3-hidroxi propionato

A partir de 5HV puede producirse un copolímero que contenga 5-hidroxi valerato-co-hidroxi propionato. Cepas K12 de *E. coli* que eran *fadR*<sup>+</sup> (degradación de ácidos grasos (FAD, acrónimo inglés de *fatty acid degradation*) reprimida) o *fadR*<sup>-</sup> (FAD constitutiva) se transfectoron con ácidos nucleicos que expresaban polihidroxi alcanoato y 5-hidroxi valerato CoA transferasa. Las cepas de *E. coli* preferidas incluían MG1655 y LS5218 (Spratt y col., J. Bacteriol. 146(3): 1166-1169 (1981)). Como se muestra en la Tabla 6, un análisis por GC-FID (cromatografía de gases con detector de ionización de llama), indicó que la cepa LS5218 [pMS93] produjo un PHA con un *dcw* (*dry cell weight*, peso seco celular) de 6,4%, con una composición polimérica de 5HV 52% y 3HP 48%. Por otro lado, la cepa MG1655 [pMS93], estaba constituida por PHA con un *dcw* de 63,1%, que consistía solo en 5HV. Adicionalmente, un análisis por GC-MS de LS5218 [pMS93] confirmó la presencia de 3HP en la muestra polimérica. Por tanto, el sistema FAD activo en LS5218 podía sintetizar 3HP a partir de Na5HV.

### III. Producción de organismos transgénicos para la producción de polihidroxi alcanoatos y productos químicos de 5 átomos de carbono

Se produjeron organismos transgénicos para la producción de polihidroxi alcanoatos y productos químicos de 5 átomos de carbono usando técnicas convencionales conocidas en la materia.

#### A. Genes para la producción de productores transgénicos de P(5HV)

En la siguiente Tabla 1A, se presentan los genes clonados y/o evaluados para cepas hospedadoras que producen PHA que contiene 5HV y productos químicos de 5 átomos de carbono, junto con el número de Comisión de Enzimas (número EC) apropiado y referencias. Como también se indican más adelante, algunos genes que se sintetizaron por optimización de codones mientras que otros se clonaron por PCR a partir de ADN genómico del organismo nativo o de tipo silvestre.

**Tabla 1A.** Genes en cepas hospedadoras microbianas productoras de PHA que contiene 5HV y productos químicos de 5 átomos de carbono

Número de reacción (Fig. 1B)	Nombre del gen	Nombre de la enzima	Número EC	N.º de registro de proteína
1	<i>davB</i>	lisina 2-monooxigenasa	1.13.12.2	BAG54787
2	<i>davA</i>	5-aminopentanamidasa	3.5.1.30	BAG54788
3	<i>davT</i>	5-aminopentanoato transaminasa	2.6.1.48	AAK97868
3	<i>gabT</i>	4-aminobutirato transaminasa	2.6.1.19	NP_417148
4	<i>gsaR<sub>At2</sub></i>	glutarato semialdehído reductasa	1.1.1.61	Gen/Proteína ID 1; XP_001210625
4	<i>gsaR<sub>At</sub></i>	glutarato semialdehído reductasa	1.1.1.61	Gen/Proteína ID 2; AAK94781
5	<i>orfZ</i>	CoA-transferasa	2.8.3.n	AAA92344
5		5-hidroxipentanoato CoA-transferasa	2.8.3.14	
6	<i>alkK</i>	acil-CoA sintetasa	6.2.1.3	Q00594
7	<i>phaC</i>	polihidroxicanoato sintasa	2.3.1.n	YP_725940
7	<i>phaC3/C5</i>	proteína de fusión de polihidroxicanoato sintasa	2.3.1.n	Gen/Proteína ID 3
7	<i>PhaEC</i>	polihidroxicanoato sintasa	2.3.1.n	Gen/Proteína ID 4 y 5
8	<i>bktB(phaA)</i>	$\beta$ -cetoacil-CoA tiasa	2.3.1.9	CAJ92573
9	<i>phaB</i>	acetoacetyl-CoA reductasa	1.1.1.36	AAD05259
10	<i>davD</i>	glutarato-semialdehído deshidrogenasa	1.2.1.20	NP_742381
10	<i>gabD</i>	succinato-semialdehído deshidrogenasa, dependiente de NADP+	1.2.1.20	NP_417147
10	<i>ynel</i>	succinato-semialdehído deshidrogenasa, dependiente de NAD+-	1.2.1.20	NP_416042
	<i>pduP</i>	propionaldehído deshidrogenasa dependiente de CoA	1.2.1.3	NP_460996
	<i>eutE</i>	aldehído deshidrogenasa prevista en la utilización de etanolamina	1.2.1.3	NP_416950
	<i>dhaT</i>	1,3-propanodiol deshidrogenasa	1.1.1.202	YP_002236499
	<i>eutG</i>	alcohol deshidrogenasa prevista, proteína de utilización de etanolamina	1.1.1.202	AP_003038
	<i>argO (yggA)</i>	proteína exportadora de arginina		NP_417398
	<i>lysE</i>	permeasa de salida de lisina		NP_600485
	<i>lysP</i>	transportador APC de lisina LysP		NP_416661
	<i>cadA</i>	lisina descarboxilasa 1	4.1.1.18	AAC77092
	<i>ldcC</i>	lisina descarboxilasa 2	4.1.1.18	AAC73297
	<i>yjeK</i>	lisina 2,3-aminomutasa	5.4.3.	AAC77106

5 Consultando bibliografía científica, patentes o búsquedas BLAST, por ejemplo, contra la base de datos de nucleótidos o proteínas del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), pueden descubrirse otras proteínas capaces de catalizar las reacciones indicadas en la Tabla 1A. Después, pueden crearse genes sintéticos para proporcionar una vía sencilla desde las bases de datos de secuencias a ADN físico. Dichos genes sintéticos se diseñan y fabrican desde la base, usando codones para potenciar la expresión de proteínas heterólogas, optimizando las características necesarias para el sistema de expresión y el hospedador. Empresas tales como, por ejemplo, DNA 2.0 (Menlo Park, CA 94025, EEUU) proporcionarán dicho servicio habitual. En las Tablas 1B-1AA se proporcionan proteínas que pueden catalizar las reacciones bioquímicas indicadas en la Tabla 1A.

10 **Tabla 1B.** Homólogos adecuados para la proteína DavB (lisina 2-monooxigenasa, de *Pseudomonas putida* cepa KT2440, EC N.º 1.13.12.2, que actúa sobre L-lisina para la producción de 5-aminopentanamida; N.º de registro de proteína BAG54787 (Revelles y col., J Bacteriol. 187: 7500-10 (2005))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
amina oxidasa	YP_001265764
amina oxidasa	YP_001666658
amina oxidasa	YP_001751665
amina oxidasa	YP_606177
amino oxidasa que contiene flavina	YP_262728
triptófano 2-monooxigenasa	YP_350882
triptófano 2-monooxigenasa	ZP_04590895
triptófano 2-monooxigenasa	NP_7790366
triptófano 2-monooxigenasa	ZP_0218996

15 **Tabla 1C.** Homólogos adecuados para la proteína DavA (5-aminopentanamidasa, de *Pseudomonas putida* cepa KT2440, EC N.º 3.5.1.30, que actúa sobre 5-aminopentanamida para la producción de 5-aminopentanoato, N.º de registro de proteína BAG54788 (Revelles y col., J Bacteriol. 187: 7500-10 (2005))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
Nitrilasa/cianida hidratasa y apolipoproteína N-aciltransferasa	YP_001265763
Nitrilasa/cianida hidratasa y apolipoproteína N-aciltransferasa	YP_001666657
Nitrilasa/cianida hidratasa y apolipoproteína N-aciltransferasa	YP_001751666
Amidohidrolasa	YP_606176
Familia de las hidrolasas que actúan sobre enlaces carbono nitrógeno	NP_790365
Familia de las hidrolasas que actúan sobre enlaces carbono nitrógeno	ZP_04590894
supuesta hidrolasa	YP_002875091
Nitrilasa/cianida hidratasa y apolipoproteína N-aciltransferasa	YP_350883
Nitrilasa	YP_703491

**Tabla 1D.** Homólogos adecuados para la proteína DavT (5-aminopentanoato transaminasa, de *Pseudomonas putida* cepa KT2440, EC N.º 2.6.1.48, que actúa sobre 5-aminopentanoato para la producción de glutarato semialdehído; N.º de registro de proteína AAK97868 (Espinosa-Urgel y Ramos, Appl. Environ. Microbiol. 67 (11), 5219-5224 (2001))),

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
4-aminobutirato aminotransferasa	YP_788435
4-aminobutirato aminotransferasa	YP_002294190
4-aminobutirato aminotransferasa	YP_345921
4-aminobutirato transaminasa	YP_002801747
4-aminobutirato aminotransferasa	YP_001333938
4-aminobutirato aminotransferasa	NP_790151
4-aminobutirato aminotransferasa, dependiente de PLP	NP_417148
4-aminobutirato aminotransferasa	YP_311652
4-aminobutirato aminotransferasa	YP_257332

5

**Tabla 1E.** Homólogos adecuados para la proteína GabT (4-aminobutirato transaminasa, de *Escherichia coli* cepa K-12 sustrato MG1655, EC N.º 2.6.1.48 (o EC N.º 2.6.1.19), que actúa sobre 5-aminopentanoato (o 4 aminobutirato) para la producción de glutarato semialdehído (semialdehído succínico); N.º de registro de proteína NP\_417148 (Riley y col., Nucleic Acids Res. 34 (1), 1-9 (2006))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
4-aminobutirato aminotransferasa	ZP_05433421
4-aminobutirato aminotransferasa	YP_002381614
proteína hipotética CIT292_04138	ZP_03838094
4-aminobutirato aminotransferasa	YP_001333938
4-aminobutirato aminotransferasa	NP_461718
4-aminobutirato aminotransferasa	NP_248957
4-aminobutirato aminotransferasa	YP_964435
4-aminobutirato aminotransferasa	YP_982853
4-aminobutirato aminotransferasa	YP_583770

10

**Tabla 1F.** Homólogos adecuados para la proteína GsaR<sub>A12</sub> (glutarato semialdehído reductasa, de *Aspergillus terreus* NIH2624, EC N.º 1.1.1.61, que actúa sobre glutarato semialdehído (o succínico semialdehído) para la producción de 5-hidroxivalerato (o 4-hidroxibutirato); N.º de registro de proteína XP\_001210625 (Birren, The Broad Institute Genome Sequencing Platform, presentación directa al NCBI)).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
aflatoxina B1-aldehído reductasa de tipo GliO, supuesta	CBF89011
aflatoxina B1-aldehído reductasa de tipo GliO	XP_752707
aflatoxina B1-aldehído reductasa, supuesta	
aflatoxina B1-aldehído reductasa de tipo GliO, supuesta	XP_001264422
aflatoxina B1 aldehído reductasa	XP_002375825

(continuación)

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
proteína hipotética An08g06440 aflatoxina B1 aldehído reductasa miembro, supuesto	EEH21318 XP_001392759 EER27170
Cadena A, Succínico Semialdehído Reductasa de Ratón, Akr7a5	2C91_A
Cadena A, Estructura de la Aflatoxina Aldehído Reductasa	2BP1_A
En Complejo con NADPH	

5 **Tabla 1G.** Homólogos adecuados para la proteína GsaR<sub>At</sub> (glutarato semialdehído) reductasa, de *Arabidopsis thaliana*, EC N.º 1.1.1.61, que actúa sobre glutarato semialdehído (o succínico semialdehído) para la producción de 5-hidroxicvalerato (o 4-hidroxicbutirato); N.º de registro de proteína AAK94781 (Breitkreuz y col., J. Biol. Chem. 278 (42), 41552-41556 (2003))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
proteína hipotética isoforma 1	XP_002266252
proteína prevista	XP_002320548
Os02g0562700	NP_001047154
semialdehído succínico) isoforma 1 reductasa	BAG16485
desconocida	ACU22717
proteína hipotética SORBIDRAFT_04g02 3180	XP_002452295
4-hidroxicbutirato deshidrogenasa dependiente de NAD	AAC41425
1, 3-propanodiol deshidrogenasa	ZP_00945634
4-hidroxicbutirato deshidrogenasa dependiente de NAD	AAA92348
4-hidroxicbutirato deshidrogenasa dependiente de NAD	NP_348201

10 **Tabla 1H.** Homólogos adecuados para la proteína OrfZ (CoA-transferasa, de *Clostridium kluveri* DSM 555, EC N.º 2.8.3.n, que actúa sobre 5-hidroxicvalerato para la producción de 5-hidroxicvaleril-CoA; N.º de registro de proteína AAA92344 (Huisman y col., Patente de Estados Unidos N.º 7.229.804; Söhling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178: 871-880 (1996))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
acetil-CoA hidrolasa/transferasa	ZP_05395303
acetil-CoA hidrolasa/transferasa	YP_001309226
4-hidroxicbutirato coenzima A transferasa	ZP_05618453
4-hidroxicbutirato CoA-transferasa	CAB60036
4-hidroxicbutirato CoA-transferasa	NP_904965

(continuación)

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
4-hidroxibutirato CoA-transferasa	ZP_05427217
acetil-CoA hidrolasa/transferasa	YP_002430388
acetil-CoA hidrolasa/transferasa	YP_001433830
acetil-CoA hidrolasa/transferasa	YP_002509648

5 **Tabla 1I.** Homólogos adecuados para la proteína AlkK (Acil-CoA sintetasa, de *Pseudomonas oleovorans*; EC N.º 6.2.1.3, que actúa sobre 5-hidroxivalerato para la producción de 5-hidroxivaleril-CoA; N.º de registro de proteína Q00594 (van Beilen y col., Mol. Microbiol. 6 (21), 3121-3136 (1992))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
sintetasa y ligasa dependiente de AMP	YP_001185941
acil-CoA sintetasa de cadena media	ABO21016
acil-CoA sintetasa	CAB69080
acil-CoA sintetasa de cadena media	ZP_06063626
acil-CoA sintetasa	YP_523641
sintetasa y ligasa dependiente de AMP	ZP_03542412
acil-CoA sintetasa	YP_726019
ligasa CoA de ácidos grasos de cadena media	ZP_06016304
ligasa CoA de ácidos grasos de cadena media	ZP_02145453

10 **Tabla 1J.** Homólogos adecuados para la proteína PhaC (polihidroxialcanoato sintasa, de *Ralstonia eutropha*, EC N.º 2.3.1.n, que actúa sobre (R)-3-hidroxibutiril-CoA + [(R)-3-hidroxibutanoato]<sub>n</sub> para la producción de [(R)-3-hidroxibutanoato]<sub>(n+1)</sub> + CoA; N.º de registro de proteína YP\_725940 (Peoples y Sinskey, J. Biol. Chem. 264: 15298-15303 (1989))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
ácido polihidroxialcanoico sintasa	YP_002005374
PHB sintasa	BAB96552
PhaC	AAF23364
proteína PhaC polihidroxialcanoato sintasa	AAC83658
polihidroxibutirato sintasa	AAL17611
ácido poli(R)-hidroxialcanoico sintasa, clase I	YP_002890098
poli-beta-hidroxibutirato polimerasa	YP_159697
PHB sintasa	CAC41638
PHB sintasa	YP_001100197

**Tabla 1K.** Homólogos adecuados para la proteína PhaE (subunidad PhaE de PhaEC PHA sintasa, de *Thiocapsa pfenigii*, que actúa sobre (R)-3-hidroxibutiril-CoA + [(R)-3-hidroxibutanoato]<sub>n</sub> para la producción de [(R)-3-hidroxibutanoato]<sub>(n+1)</sub> + CoA).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
orf2 5' en phbC	AAC60429
proteína de 40,5 kDa no caracterizada en la región intergénica phbC-phbA	P45372
proteína hipotética 2	S29275
proteína de 41,3 kDa no caracterizada en la región intergénica phbC-phbA	P45367
ácido poli(R)-hidroxialcanoico sintasa, clase III, subunidad PhaE	ZP_04775558
proteína hipotética Tgr7_1513	YP_002513584
PHA sintasa subunidad PhaE	AAG30260
ácido poli(R)-hidroxialcanoico sintasa, clase III, subunidad PhaE	YP_865086
PHA sintasa	BAE20054
PHA sintasa subunidad E	ABK60192

**Tabla 1L.** Homólogos adecuados para la proteína PhaC (subunidad PhaC de PhaEC PHA sintasa, de *Thiocapsa pfenigii*, que actúa sobre (R)-3-hidroxi-butiril-CoA + [(R)-3-hidroxi-butanoato]<sub>n</sub> para la producción de [(R)-3-hidroxi-butanoate]<sub>(n+1)</sub> + CoA).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
ácido poli(R)-hidroxilcanoico sintasa, clase III, subunidad PhaC	ZP_04774202
Poli-beta-hidroxi-butirato polimerasa	P45366
PHA sintasa subunidad PhaC	AAG30259
ácido poli(R)-hidroxilcanoico sintasa, clase III, subunidad PhaC	YP_865087
poli (ácido 3-hidroxi-butírico) sintasa	YP_200860
poli(3-hidroxi-alcanoato) sintasa	YP_001660017
PhaC	AAL76316
poli(3-hidroxi-alcanoato) sintasa	NP_440750
ácido poli(R)-hidroxilcanoico sintasa, clase III, subunidad PhaC	YP_003151887
ácido poli(R)-hidroxialcanoico sintasa, clase III, subunidad PhaC	YP_001374365

5

**Tabla 1M.** Homólogos adecuados para la proteína BktB (PhaA) (β-cetoacil-CoA tiolasa, de *Ralstonia eutropha* H16, EC N.º 2.3.1.9, que actúa sobre acetil-CoA para la producción de acetoacetil-CoA; N.º de registro de proteína CAJ92573 (Peoples y Sinskey, J Biol Chem. 15 de septiembre de 1989; 264(26): 15293-7. Pohlmann y col., Nature Biotech 24 (10), 1257-1262 (2006))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
acetil-CoA acetiltransferasa	YP_002005375
acetil-CoA acetiltransferasa	YP_558680

(continuación)

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
acetil-CoA acetiltransferasa	BAB96553
acetil-CoA acetiltransferasa	YP_001021062
beta-cetotiolasa	BAA33156
acetil-CoA acetiltransferasa	YP_523809
acetil-CoA acetiltransferasa	NP_250691
beta-cetotiolasa	YP_002802211
acetil-CoA acetiltransferasa	YP_001919890

5 **Tabla 1N.** Homólogos adecuados para la proteína PhaB (acetoacetil-CoA reductasa, de *Bacillus megaterium*, EC. N.º 1.1.1.36, que actúa sobre acetoacetil-CoA para la producción de (R)-3-hidroxi-butiril-CoA; N.º de registro de proteína AAD05259 (McCool y Cannon, J. Bacteriol. 183 (14), 4235-4243 (2001))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
acetoacetil-CoA reductasa	NP_831099
3-cetoacil-(acil-transportador-proteína) reductasa	YP_645133
3-cetoacil-(acil-transportador-proteína) reductasa	ZP_01126888
proteína hipotética DSI2660	YP_518893
3-cetoacil-(acil-transportador-proteína) reductasa	YP_001865860
3-cetoacil-(acil-transportador-proteína) reductasa	YP_001658404
3-oxoacil-(acil-transportador-proteína) reductasa	YP_002949207
3-oxoacil-(acil-transportador-proteína) reductasa	NP_371755
3-cetoacil-(acil-transportador-proteína) reductasa	YP_001385912

**Tabla 1O.** Homólogos adecuados para la proteína DavD (glutarato-semialdehído deshidrogenasa, de *Pseudomonas putida* KT2440, EC N.º 1.2.1.20, que actúa sobre glutarato semialdehído para la producción de glutarato; N.º de registro de proteína NP\_742381 (Espinosa-Urgel y Ramos, Appl. Environ. Microbiol. 67 (11), 5219-5224 (2001))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
succinato-semialdehído deshidrogenasa I	YP_605978
succinato-semialdehído deshidrogenasa I	YP_345920
succinato-semialdehído deshidrogenasa I, dependiente de NADP	NP_417147
aldehído deshidrogenasa prevista	NP_416042
succinato-semialdehído deshidrogenasa I	NP_461717
aldehído deshidrogenasa	YP_002801982
succínico semialdehído deshidrogenasa	YP_002827846
succínico semialdehído deshidrogenasa	YP_001228901
succinato-semialdehído deshidrogenasa (NADP+)	YP_841054

**Tabla 1P.** Homólogos adecuados para la proteína GabD (succinato semialdehído deshidrogenasa, dependiente de NADP<sup>+</sup>, de *Escherichia coli* cepa K-12 sustrato MG1655, EC N.º 1.2.1.20, que actúa sobre glutarato semialdehído (o succínico semialdehído) para la producción de glutarato (o succinato); N.º de registro de proteína NP\_417147 (Riley y col., Nucleic Acids Res. 34 (1), 1-9 (2006))),

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
succinato-semialdehído deshidrogenasa I	ZP_05433422
succinato-semialdehído deshidrogenasa (NAD(P)(+))	YP_001744810
proteína hipotética CIT292_04137	ZP_03838093
succinato-semialdehído deshidrogenasa	YP_002638371
succinato-semialdehído deshidrogenasa I	YP_001333939
succinato-semialdehído deshidrogenasa I	NP_742381
succinato-semialdehído deshidrogenasa [NADP+] (ssdh)	YP_002932123
succínico semialdehído deshidrogenasa	YP_001951927
succinato semialdehído deshidrogenasa	YP_298405

5

**Tabla 1Q.** Homólogos adecuados para la proteína Ynel (Sad) (succinato semialdehído deshidrogenasa, dependiente de NAD<sup>+</sup>, de *Escherichia coli* cepa K-12 sustrato MG1655, EC N.º 1.2.1.24, que actúa sobre glutarato semialdehído (succínico semialdehído) para la producción de glutarato (succinato); N.º de registro de proteína NP\_416042 (Fuhrer y col., J Bacteriol. Nov 2007; 189(22): 8073-8. Dennis y Valentin, Patente de Estados Unidos N.º 6.117.658))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
succinato semialdehído deshidrogenasa	NP_805238
supuesta aldehído deshidrogenasa	YP_002919404
aldehído deshidrogenasa	NP_745295
aldehído deshidrogenasa	ZP_03269266
aldehído deshidrogenasa	ZP_05726943
aldehído deshidrogenasa	YP_001906721
proteína hipotética	BAF01627
aldehído deshidrogenasa	ZP_03739186
succinato-semialdehído deshidrogenasa	NP_637690

10

**Tabla 1R.** Homólogos adecuados para la proteína PduP (propionaldehído deshidrogenasa dependiente de CoA, de *Salmonella typhimurium* LT2, EC N.º 1.2.1.3, que actúa sobre 5-hidroxivaleril-CoA para la producción de 5-hidroxipentalanal; N.º de registro de proteína NP\_460996 (Leal y col., Arch. Microbiol. 180: 353-361 (2003), McClelland y col., Nature 413: 852-856 (2001))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
proteína de utilización de etanolamina EutE	YP_002216136
PduP	ZP_04562531
proteína de utilización de propanodiol	YP_002236771
proteína de utilización de etanolamina EutE	NP_756394
aldehído deshidrogenasa	YP_961823

(continuación)

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
posible aldehído deshidrogenasa	ZP_04969437
proteína de utilización de etanolamina eutE	ZP_04637794
Aldehído Deshidrogenasa	ZP_05373182
proteína de utilización de etanolamina EutE	YP_002350444

5 **Tabla 1S.** Homólogos adecuados para la proteína EutE (prevista aldehído deshidrogenasa, proteína de utilización de etanolamina de *Escherichia coli* cepa K-12 sustrato MG1655, EC N.º 1.2.1.3, que actúa sobre 5-hidroxicinnil-CoAtp para la producción de 5-hidroxipentanal, N.º de registro de proteína NP\_416950 (Riley y col., Nucleic Acids Res. 34 (1), 1-9 (2006))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
proteína hipotética SPAB_00490	YP_001586756
proteína de utilización de etanolamina	YP_001336429
probable etanolamina	ZP_01222600
proteína de utilización (EutE)	
supuesta aldehído deshidrogenasa	ZP_03337600
proteína utilización de etanolamina eutE	ZP_04573939
propionaldehído deshidrogenasa dependiente de CoA	ZP_00232619
Aldehído Deshidrogenasa	YP_003261430
EutE	YP_311399
proteína hipotética CKO_00340	YP_001451939
proteína de utilización de etanolamina (EutE)	YP_066775

10 **Tabla 1T.** Homólogos adecuados para la proteína DhaT (1,3-propanodiol deshidrogenasa, de *Klebsiella pneumonia* 342, EC N.º 1.1.1.202, que actúa sobre 5-hidroxipentanal para la producción de 1,5-pentanodiol; N.º. de registro de proteína YP\_002236499 (Fouts y col., PLoS Genet. 4 (7), E1000141 (2008))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
1, 3-propanodiol deshidrogenasa	ABD74004
1, 3-propanodiol deshidrogenasa	YP_698334
alcohol deshidrogenasa	YP_001211060
1, 3-propanodiol deshidrogenasa	YP_796272
alcohol deshidrogenasa que contiene hierro	YP_003192340
proteína hipotética conservada	ZP_06063679
proteína hipotética BB14905_12250	ZP_01723545
proteína EutG	ZP_02497862
1, 3-propanodiol deshidrogenasa	AAX12915
1, 3-propanodiol deshidrogenasa	AAM54730

**Tabla 1U.** Homólogos adecuados para la proteína EutG (alcohol deshidrogenasa prevista en la utilización de etanolamina, de *Escherichia coli* cepa K-12 sustrato W3110, EC. N.º 1.1.1.202, que actúa sobre 5-hidroxipentanal para la producción de 1,5-pentanodiol; N.º de registro de proteína AP\_003038 (Riley y col., Nucleic Acids Res. 34 (1), 1-9 (2006))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
proteína de utilización de etanolamina EutG	YP_001881244
proteína hipotética CKO_00342	YP_001451941
proteína hipotética SPAB_00492	YP_001586758
supuesta proteína de transporte en la utilización de etanolamina	YP_002920649
supuesta alcohol deshidrogenasa	ZP_03365534
proteína de utilización de etanolamina EutG	ZP_02156849
proteína de utilización de etanolamina EutG	ZP_04637792
eutG	AAA80211
alcohol deshidrogenasa que contiene hierro	NP_634793
proteína de utilización de etanolamina EutG	ZP_06015246

5

**Tabla 1V.** Homólogos adecuados para la proteína ArgO (YggA) (proteína exportadora de arginina, de *Escherichia coli* cepa K-12 sustrato MG1655, que actúa sobre L-lisina (citoplasma) y produce L-lisina (exterior); N.º de registro de proteína NP\_417398 (Nandineni y Gowrishankar, J. Bacteriol. 186: 3539-3546 (2004))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
proteína exportadora de arginina	YP_409404
producto de proteína sin nombre	CAA32607
proteína exportadora de arginina	ZP_04560344
proteína exportadora de arginina	NP_461982
proteína exportadora de arginina	YP_001336979
proteína exportadora de arginina argO	YP_003211829
proteína exportadora de arginina	YP_002649944
proteína exportadora de arginina argO	ZP_04613777
proteína exportadora de arginina	NP_930824
proteína exportadora de arginina ArgO	ZP_01988459

10

**Tabla 1W.** Homólogos adecuados para la proteína LysE (permeasa de salida de lisina de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, que actúa sobre L-lisina (citoplasma) para la producción de L-lisina (exterior); N.º de registro de proteína NP\_600485 (Tokio Research Laboratories, Kogyo Co. Ltd., Japón, presentación directa al NCBI)).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
proteína exportadora de lisina	Q8RQM4
proteína exportadora de arginina ArgO	ZP_04835056
proteína exportadora de lisina	ZP_0393395

(continuación)

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
proteína exportadora de lisina	ZP_03931790
exportador de L-lisina	YP_002958101
proteína exportadora de lisina	ZP_05123881
LysE transportador de aminoácidos	NP_794117
proteína exportadora de arginina	ZP_03832031
proteína ECs3794 hipotética	ACI78466
transportador de la familia de LysE	NP_353947

5 **Tabla 1X.** Homólogos adecuados para la proteína LysP (transportador APC de lisina LysP, de *Escherichia coli* cepa K-12 sustrato MG1655, que actúa sobre L-lisina (exterior) y que produce L-lisina (citoplasma); N.º de registro de proteína NP\_416661 (Steffes y col., J Bacteriol 174(10): 3242-9 (1992))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
transportador de lisina	YP_002383360
proteína CIT292_03450 hipotética	ZP_03837490
transportador de lisina	YP_001336242
permeasa específica de lisina	YP_003211189
transportador de lisina	ZP_03383884
transportador de lisina	NP_930088
permeasa específica de lisina	ZP_04623004
región asociada a permeasa de aminoácidos	YP_001565334
permeasa específica de lisina, superfamilia (APC) organización poliamina-aminoácido;	YP_002008821
región asociada a permeasa de aminoácidos	YP_776515

**Tabla 1Y.** Homólogos adecuados para la proteína CadA (lisina descarboxilasa 1, de *Escherichia coli* cepa K-12 sustrato W3110, que actúa sobre lisina para la producción de Cadaverina; N.º de registro de proteína AP\_004633 (Riley y col., Nucleic Acids Res. 34 (1), 1-9 (2006))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
lisina descarboxilasa	ZP_06166000
proteína SARI_00317 hipotética	YP_001569398
familia Orn/Lys/Arg descarboxilasa, supuesta	YP_002932309
Arginina / lisina / ornitina descarboxilasa	ZP_06179259
lisina descarboxilasa 1	YP_205440
lisina descarboxilasa	ZP_04636370
lisina descarboxilasa 2	ZP_04559973
lisina descarboxilasa 2, constitutiva	YP_002396273

(continuación)

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
lisina descarboxilasa	ZP_04617787
lisina descarboxilasa, constitutiva	YP_855733

**Tabla 1Z.** Homólogos adecuados para la proteína LdcC (lisina descarboxilasa 2, de *Escherichia coli* cepa K-12 sustrato MG1655, que actúa sobre lisina para la producción de Cadaverina; N.º de registro de proteína NP\_414728 (Riley y col., Nucleic Acids Res. 34(1), 1-9 (2006))).

5

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
lisina descarboxilasa 2	NP_706131
proteína CKO_03180 hipotética	YP_001454701
lisina descarboxilasa constitutiva	ZP_02686615
lisina descarboxilasa, constitutiva	YP_002240326
lisina descarboxilasa, constitutiva	YP_003209178
lisina descarboxilasa	YP_002647915
lisina descarboxilasa	ZP_04621086
lisina descarboxilasa 1	YP_003294813
lisina descarboxilasa 1	YP_859739
familia Orn/Lys/Arg descarboxilasa, supuesta	YP_002931768

**Tabla 1AA.** Homólogos adecuados para la proteína YjeK (lisina 2,3-aminomutasa, de *Escherichia coli* cepa K-12 sustrato MG1655, que actúa sobre L-lisina para la producción de (R)-b-lisina; N.º de registro de proteína NP\_418570 (Riley y col., Nucleic Acids Res. 34 (1), 1-9 (2006))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
proteína SFV_4304 hipotética	YP_691589
supuesta lisina aminomutasa	YP_002385208
proteína hipotética conservada	ZP_04559561
proteína de la familia KamA	YP_002240896
supuesta aminomutasa	NP_463197
proteína ESA_00156 hipotética	YP_001436296
lisina 2, 3-aminomutasa proteína de la familia YodO	YP_003019317
proteína ETAE_0333 hipotética	YP_003294390
proteína yjEK de la familia kamA no caracterizada	ZP_04617468
lisina 2, 3-aminomutasa	YP_002157135

10

Una realización proporciona un organismo transgénico o recombinante para la producción de P(5HV) o de otros PHA que contienen monómeros de 5HV. El organismo puede ser procariota o eucariota. Los procariotas adecuados incluyen, pero sin limitación, bacterias, por ejemplo *E. coli*.

## B. Procedimientos y materiales para la producción de organismos o células recombinantes

### 1. Organismos o células a modificar

Los organismos o células que pueden modificarse para la producción de biopolímeros de PHA que contienen 5HV, 5-aminopentanoato (5AP), 5-hidroxicvalerato (5HV), glutarato y 1,5-pentanodiol (PDO), incluyen eucariotas y procariotas. Los procariotas adecuados incluyen bacterias. Diversas bacterias pueden modificarse genéticamente para la producción de polihidroxicvalcanoatos. Los ejemplos incluyen *E. coli*, *Alcaligenes latus*, *Alcaligenese eutrophus*, *Azotobacter*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Corynebacterium glutamicum*, *Rhodococcus* y *Brevibacterium lactofermentum*. Otros procariotas incluyen, pero sin limitación, eubacterias, tales como organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tal como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* se encuentran disponibles al público, tales como la cepa K12 de *E. coli* MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); (ATCC 27.325) y K5772 (ATCC 53.635).

Estos organismos incluyen los que ya producen polihidroxicvalcanoatos, modificados para utilizar sustratos alternativos o para incorporar monómeros adicionales, o aumentar la producción, y organismos que no producen polihidroxicvalcanoatos, pero que no expresan ninguna de algunas de las enzimas necesarias para la producción de polihidroxicvalcanoatos. *R. eutropha* es un ejemplo de un organismo que produce PHA de manera natural. *E. coli* y *C. glutamicum* son ejemplos de organismos en los que sería necesario introducir transgenes que codifiquen las enzimas para la producción de PHA.

Para la producción de los productos químicos C5, 5-aminopentanoato (5AP), 5-hidroxicvalerato (5HV), glutarato y 1,5-pentanodiol, donde no se polimerizan a 5-hidroxicvalerato que contienen PHA, pero se secretan en el medio de cultivo es útil entonces utilizar microorganismos industriales que se utilizan para la fabricación de lisina. *Corynebacterium glutamicum*, incluyendo sus subespecies *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium efficiens* y *Brevibacterium divaricatum*, que se han utilizado para la producción industrial de L-lisina (Microbiol. Monogr.5: 39-70 (2007)), es un ejemplo de microorganismos que pueden desarrollarse para la producción de glutarato, 1,5-pentanodiol, 5-hidroxicvalerato y otros productos que pueden producirse a partir de lisina mediante las rutas de degradación de lisina descritas en la presente invención. *E. coli* modificada por ingeniería genética también se ha utilizado para la producción de lisina. Los procedimientos para obtener cepas de *C. glutamicum* para la producción de L-lisina, tales como mutagénesis al azar y selección posterior del mutante que es resistente a análogos tóxicos de lisina, tal como S-(2-aminoetil) cisteína, y la introducción de alelos mutantes de genes diana, tales como *lysC* y *hom* que codifican aspartato quinasa y homoserina deshidrogenasa, respectivamente, están muy establecidos y se han descrito (Curr. Opin. Microbiol. 9: 268-274 (2007)). La aspartato quinasa se somete a una inhibición de retroalimentación por treonina y lisina, y la liberación de esta enzima de la inhibición por retroalimentación se considera como una de las características clave para desarrollar cepas productoras de lisina. Otra diana de modificación genética para el desarrollo de cepas capaces de producir productos químicos precedentes de rutas de degradación de lisina es el exportador de lisina tal como *LysE* en *C. glutamicum*. La mutagénesis del gen *lysE* de cepas de *C. glutamicum* productoras de L-lisina, impedirá la secreción de lisina desde el citoplasma y por tanto aumentará la producción de productos mediante la ruta diseñada para convertir lisina en los productos. En la técnica también se conocen procedimientos para construir cepas de *C. glutamicum* para la producción de PHA tal como PHB (Jo, S-T y col., 2006. J. Bioscience and Bioengineering 102: 233-236).

Las células u organismos eucariotas adecuados incluyen hongos, tales como hongos filamentosos o levaduras. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador eucariota inferior habitualmente utilizado.

### 2. Procedimientos para generar organismos transgénicos

#### i. Transfección extracromosómica

A través de técnicas de transformación o de transfección convencionales, puede introducirse ADN vector en células procariotas o eucariotas. Tal y como se utilizan en el presente documento, los términos "transformación" y "transfección", pretenden referirse a una variedad de técnicas reconocidas en la materia para la introducción de ácido nucleico exógeno (por ejemplo, ADN) en una célula hospedadora, entre las que se incluyen, transformación química, tal como transfección con fosfato de calcio o co-precipitación con cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. En Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001, se describen técnicas de transformación convencionales. Normalmente, las transformaciones en levadura se realizan de acuerdo con el procedimiento de Van Solingen y col. J. Bact., 130: 946 (1977) y de Hsiao y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979).

#### ii. Integración cromosómica

Los expertos en la técnica conocen bien procedimientos para la incorporación de construcciones de genes modificados por ingeniería genética en el ADN cromosómico de células bacterianas gram negativas y gram positivas. Los mecanismos de integración típicos incluyen recombinación homóloga utilizando ADN linealizado en cepas *recBC* o *recD* seguido de transducción P1 (Miller 1992, A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory

Manual & Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) plásmidos especiales (Hamilton y col., J. Bacteriol. 171: 4617 (1989); Metcalf y col., Plasmid 35: 1 (1996); Patente de Estados Unidos N.º 5.470.727 de Mascarenhas y col.), o por inserción al azar usando sistemas basados en transposones (Herrero y col. J. Bacteriol. 172: 6557 (1990); Peredelchuk y Bennett, Gene 187: 231 (1997); Patente de Estados Unidos N.º 5.595.889 de Richaud y col.; Patente de Estados Unidos N.º 5.102.797 de Tucker y col.). En general, las cepas microbianas que contienen una inserción se seleccionan en función de un gen de resistencia a antibióticos adquirido que se proporciona a través de la construcción integrada. Sin embargo, también puede utilizarse complementación de mutantes auxotróficos. Para introducir cualquiera de los transgenes que codifican las diversas rutas metabólicas descritas en el presente documento pueden utilizarse los mismos procedimientos. Algunos de estos procedimientos se describen más adelante con más detalle con respecto a los genes *pha*.

La expresión de los genes de interés para la integración cromosómica puede realizarse incluyendo una secuencia activadora de la transcripción (promotora) en la construcción de ADN a integrar. La recombinación homóloga, dirigida pueden combinarse con amplificación de expresión de genes de interés, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.000.000 de Ingram y col.

La integración cromosómica también puede realizarse mediante los procedimientos de Datsenko y Wanner (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6640-6645 (2000)), y como se utiliza en el Ejemplo 7, más adelante.

Para la inserción de genes heterólogos en cromosomas bacterianos se ha desarrollado una serie de casetes de expresión. Estos casetes se basan en los sistemas de suministro de transposones descritos por Herrero y col., J. Bacteriol. 172: 6557-67 (1990); de Lorenzo y col., J. Bacteriol. 172: 6568 (1990). Aunque estos sistemas especifican la transferencia conyugal mediada por RP4 y utilizan solo los transposones Tn10 y Tn5, cualquier combinación de extremos de transposón y sistema de suministro podría adaptarse a la tecnología descrita, dando como resultado una producción de PHA sostenida y homogénea.

Para la generación de productores transgénicos de PHB de *E. coli* se utilizó la siguiente estrategia general: (1) un gen de resistencia a antibiótico (*abr*) sin promotor se clonó en el polienlazador de un plásmido adecuado tal como pUC18NotI o pUC18Sfil de tal manera que la mayor parte del polienlazador estaba corriente arriba de *abr*; (2) genes *pha*, genes que codifican una GABA transaminasa, una succínico semialdehído reductasa y una 4-hidroxibutirato-CoA transferasa se clonaron posteriormente corriente arriba del gen *abr* y en la misma orientación que la del gen *abr*; (3) el casete *pha-abr* se escindió como un fragmento NotI o AvrII (*AvrII* reconoce el sitio *Sfil* en pUC18Sfil) y se clonó en los sitios correspondientes de cualquier plásmido como los de las series pUT- o pLOF-; (4) los plásmidos resultantes se mantuvieron en cepas de *E. coli*  $\lambda$  *pir* y se sometieron a electroporación o se conjugaron en la cepa de *E. coli* de elección en la que estos plásmidos no se replican; y (5) nuevas cepas en las que el casete *pha-abr* se había integrado satisfactoriamente en el cromosoma, se seleccionan en medio selectivo para el hospedador (por ejemplo, ácido naladixico cuando el hospedador es resistente a ácido naladixico) y para el casete (por ejemplo, cloranfenicol, kanamicina, tetraciclina, cloruro de mercurio, bialafos). Los integrantes de *pha* resultantes se exploraron en medio mínimo en presencia de glucosa con respecto al crecimiento y formación de PHB.

En este procedimiento pueden realizarse diversas modificaciones. Si no se utiliza el marcador de resistencia a antibiótico sin promotor, la inserción de los genes de PHA se selecciona basándose en un marcador presente en el vector y cepas integradas productoras del nivel deseado de PHA se detectan explorando la producción de PHA. Los genes *pha* pueden tener, pero no necesariamente, secuencias de transcripción endógenas, tales como secuencias activadoras corriente arriba, sitios de unión a la ARN polimerasa y/o secuencias operadoras. Si los genes *pha* no tienen dichas secuencias, la estrategia descrita está limitada al uso de vectores como los de la serie pUT en las que la transcripción puede proseguir a través de las secuencias de inserción. Esta limitación se debe a la incapacidad de la ARN polimerasa de leer a través de las regiones flanqueantes Tn10 de los plásmidos pLOF. El gen *abr* puede llevar sus propias secuencias de expresión si se desea. En lugar de un gen *abr*, la construcción puede diseñarse de tal manera que un gen esencial actúa como un marcador selectivo cuando la cepa hospedadora tiene una mutación en el gen de tipo silvestre correspondiente. En la técnica se conocen en general ejemplos de genes útiles para este fin. En un hospedador pueden integrarse diferentes construcciones, posterior o simultáneamente, siempre que ambas construcciones lleven diferentes marcadores. Utilizando eventos de integración múltiples, los genes *pha* pueden integrarse por separado, por ejemplo, el gen de PHB polimerasa se integra primero como un casete *phaC-cat*, seguido de la integración de los genes de tiolasa y reductasa como un casete *phaAB-kan*. Como alternativa, un casete puede contener todos los genes *pha* mientras que otro casete solo contiene algunos genes *pha* requeridos para la producción de un polímero de PHA deseado.

En algunos casos, puede utilizarse un vector de integración de transposones, tal como pJMS11 (Panke y col. Appl. Environ. Microbiol. 64: 748-751) de tal manera que el marcador de selección puede escindirse del cromosoma de la cepa integrada. Esto es útil por diversas razones, entre las que se incluye el proporcionar un mecanismo para insertar construcciones de transposones múltiples utilizando el mismo gen marcador escindiendo el marcador después de cada evento de inserción.

### 3. Fuentes de *pha* y otros genes implicados en la formación de PHA

Una referencia general para genes implicados en la formación de PHA es Madison y Huisman, 1999, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 21-53. Los genes *pha* pueden proceder de diferentes fuentes y combinarse en un solo organismo, o pueden proceder de la misma fuente.

#### 5 i. Genes que codifican reductasa

Los genes que codifican reductasa se han aislado de *A. latus*, *R. eutropha* (Peoples y Sinskey, *J. Biol. Chem.* 264(26): 15298-303 (1989); *Acinetobacter* sp. (Schembri, y col., *J. Bacteriol.* 177(15): 4501-7 (1995)), *C. vinosum* (Liebergesell y Steinbuchel, *Eur. J. Biochem.* 209(1): 135-50 (1992)), *P. acidophila*, *P. denitrificans* (Yabutani, y col., *FEMS Microbiol. Lett.* 133 (1-2): 85-90 (1995)), *R. meliloti* (Tombolini, y col., *Microbiology* 141: 2553-59 (1995)), y *Z. ramigera* (Peoples, y col., *J. Biol. Chem.* 262(1):97-102 (1987)). La Patente de Estados Unidos N.º 7.229.804 desvela organismos transgénicos que producen P4HB utilizando el gen *4hbD* que codifica 4-hidroxitbutirato deshidrogenasa de *C. kluyveri* (Sohling y Gottschalk, *J. Bacteriol.* 178,871 880 (1996)). El gen *4hbD* requiere NADH. Las reductasas preferidas incluyen, pero sin limitación, las que no requieren NADH. Como reductasas ejemplares se incluyen *AKR7A5* de *Mus musculus* (GenInfo Identifier: 27659727) (Hinshelwood, A. y col. *FEBS Letters* 523: 213-218 (2002)), *GHBDH* de *Arabidopsis thaliana* (GI:145338934) (Breitkreuz, K. y col. *J. Biol. Chem.* 278: 41552-41556, ATEG\_00539 de *Aspergillus terreus* (GI:115491994).

#### ii. CoA transferasa y CoA sintetasa

Las CoA transferasas (EC 2.8.3.n) adecuadas incluyen, pero sin limitación, *orfZ* de *C. kluyveri*. La secuencia de *orfZ* se proporciona en la Patente de Estados Unidos N.º 7.229.804 de Huisman y col. Otra CoA transferasa adecuada incluye *abfT* de *C. aminobutyricum* (Gerhardt y col., *Arch Microbiol* 74: 189-199 (2000)). Otras enzimas que podrían producir acil-CoA incluyen CoA sintetasa (EC 6.2.1.3). Estas enzimas utilizan ATP y CoA libre para catalizar la adición covalente de CoA para el ácido carboxílico y se han descrito en van Beilen y col. (*Molec Microbiol* (1992) 6:3121-3136) y en Aquin y col. (documento WO 02/40690 A2).

#### iii. Genes que codifican PHA polimerasa

Se han aislado genes que codifican PHA polimerasa de *Aeromonas caviae* (Fukui y Doi, *J. Bacteriol.* 179(15): 4821-30 (1997)), *A. latus*, *R. eutropha* (Peoples y Sinskey, *J. Biol. Chem.* 264(26): 15298-303 (1989); *Acinetobacter* (Schembri, y col., *J. Bacteriol.* 177(15): 4501-7 (1995)), *C. vinosum* (Liebergesell y Steinbuchel, *Eur. J. Biochem.* 209(1): 135-50 (1992)), *Methylobacterium extorquens* (Valentin y Steinbuchel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39(3): 309-17 (1993)), *Nocardia corallina* (N.º Reg. GenBank AF019964), *Nocardia salmonicolor*, *P. acidophila*, *P. denitrificans* (Ueda, y col., *J. Bacteriol.* 178(3): 774-79 (1996)), *Pseudomonas aeruginosa* (Timm y Steinbuchel, *Eur. J. Biochem.* 209(1): 15-30 (1992)), *Pseudomonas oleovorans* (Huisman, y col., *J. Biol. Chem.* 266: 2191-98 (1991)), *Rhizobium etli* (Cevallos, y col., *J. Bacteriol.* 178(6): 1646-54 (1996)), *R. meliloti* (Tombolini, y col., *Microbiology* 141 (Pt 10): 2553-59 (1995)), *Rhodococcus ruber* (Pieper y Steinbuchel, *FEMS Microbiol. Lett.* 96(1): 73-80 (1992)), *Rhodospirillum rubrum* (Hustede, y col., *FEMS Microbiol. Lett.* 93: 285-90 (1992)), *Rhodobacter sphaeroides* (Steinbuchel, y col., *FEMS Microbiol. Rev.* 9(2-4): 217-30 (1992); Hustede, y col., *Biotechnol. Lett.* 15: 709-14 (1993)), *Synechocystis* sp. (Kaneko, *DNA Res.* 3(3): 109-36 (1996)), *T. violaceae* (Liebergesell & Steinbuchel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38(4): 493-501 (1993)) y *Z. ramigera* (N.º Reg. GenBank U66242).

También pueden utilizarse otros genes que no se han implicado en la formación de PHA pero que comparten homología significativa con los genes *pha* y/o con los productos génicos correspondientes. Se han aislado genes con homología significativa a la del gen *phaB* que codifica la acetoacetil CoA reductasa de diversos organismos, entre los que se incluyen *Azospirillum brasiliense* (NCBI N.º de Registro X64772, X52913) *Rhizobium* sp. (N.º de registro NCBI U53327, Y00604), *E. coli* (N.º de registro NCBI D90745), *Vibrio harveyi* (N.º de registro NCBI U39441), *H. influenzae* (N.º de registro NCBI U32701), *B. subtilis* (N.º de registro NCBI U59433), *P. aeruginosa* (N.º de registro NCBI U91631), *Synechocystis* sp. (N.º de registro NCBI D90907), *H. pylori* (N.º de registro NCBI AE000570), *Arabidopsis thaliana* (N.º de registro NCBI X64464), *Cuphea lanceolata* (N.º de registro NCBI X64566) y *Mycobacterium smegmatis* (N.º de registro NCBI U66800).

### III. Procedimientos de producción de PHA que contienen 5HV y productos químicos C5

Se proporcionan procedimientos para la producción de polihidroxialcanoatos utilizando fuentes de carbono renovables como materia prima. En una realización preferida, las bacterias se transforman o transfectan con una o más construcciones de ácidos nucleicos que codifican los genes necesarios para la producción de 5-aminopentanoato (5AP), 5-hidroxivalerato (5HV), glutarato y 1,5-pentanodiol (PDO) y polímeros de los mismos a partir de fuentes renovables.

### IV. Procedimientos de uso

Los organismos transgénicos desvelados pueden utilizarse para la producción de productos químicos C5, tales como 5-aminopentanoato (5AP), 5-hidroxivalerato (5HV), glutarato y 1,5-pentanodiol (PDO), así como biopolímeros de PHA que comprenden monómeros de 5HV. En el caso de la producción de los productos químicos de 5 átomos

de carbono, C5, el organismo recombinante que expresa el transgén, o los transgenes, apropiado(s), opcionalmente incluyendo los que tienen genes que codifican rutas competidoras inactivadas o eliminadas, se cultivan en un sustrato de fermentación renovable. El sustrato se selecciona entre hidratos de carbono, lisina, prolina, aceites vegetales, ácidos grasos o combinaciones de los mismos. Una combinación útil para algunas realizaciones sería una mezcla de glucosa y lisina. Otra combinación adecuada sería sacarosa y lisina. Preferentemente la materia prima comprende predominantemente un sustrato, por ejemplo, glucosa o sacarosa. Los sustratos de hidratos de carbono adecuados comprenden uno o más azúcares seleccionados de glucosa, fructosa, xilosa, arabinosa, sacarosa, lactosa y maltosa. Para la producción de productos químicos C5, el organismo recombinante se cultiva en el sustrato renovable hasta que el producto final deseado se acumula en el medio de cultivo, momento en el cual las células se retiran por floculación, sedimentación, centrifugación o filtración y el producto se recupera del medio celular por procedimientos convencionales. Para la recuperación de otros ácidos producidos por fermentación y dioles tales como ácido láctico, ácido succínico, ácido 3-hidroxipropiónico, 1,3-propanodiol y 1,4-butanodiol, dichos procedimientos son conocidos en la técnica.

Los organismos recombinantes pueden utilizarse para la producción por fermentación de biopolímeros de PHA que contienen 5HV incluyendo copolímeros de PHA que contienen homopolímero de P5HV y 5HV cultivando los organismos en presencia de fuentes de carbono renovables tales como glucosa, lisina, etc. y otros sustratos seleccionados para proporcionar un polímero o un copolímero deseado. Los organismos recombinantes se cultivan en los sustratos hasta que los polímeros de PHA se han acumulado dentro de las células, momento en el cual los polímeros de PHA se extraen de las células por procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Los polímeros de PHA que contienen 5HV obtenidos de los organismos, pueden utilizarse en una gran variedad de aplicaciones plásticas industriales, tales como para películas, fibras, espumas, artículos moldeados por inyección, frascos moldeados por soplado, recubrimientos de papel y similares. Estos también pueden utilizarse para aplicaciones biomédicas incluyendo el aumento de tejido, para la producción de válvulas cardíacas, como suturas, y para la producción de injertos vasculares. Como ejemplos de copolímeros se incluyen, pero sin limitación, PHB5HV y p(3-hidroxipropionato-co-5-hidroxivalerato) p(4-hidroxibutirato-co-5-hidroxivalerato). Los organismos recombinantes pueden modificarse por ingeniería genética para incluir genes adicionales tales como beta-cetotilasa y acetoacetil-CoA reductasa según sea necesario para la producción de copolímeros.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado al normalmente entendido por un experto en la técnica a la cual pertenece la invención desvelada.

### **Ejemplos**

#### **Ejemplo 1: Biosíntesis del homopolímero P(5HV) a partir de 5-hidroxivalerato de sodio**

Como una primera demostración de la capacidad de sintetizar PHA que contienen 5HV, se suministró 5-hidroxivalerato de sodio (Na5HV) a cepas de *E. coli* que expresaban tanto una CoA transferasa o CoA sintetasa como una PHA sintetasa, para determinar si el monómero 5HV suministrado podría aceptarse e incorporarse directamente en el homopolímero P(5HV), el Na5HV se sintetizó mediante hidrólisis básica de  $\delta$ -valerolactona (DVL). Este procedimiento implicó la adición de NaOH 0,1 mol a metanol 50 ml con agitación hasta su disolución. Para ello, se añadió DVL 0,1 mol con agitación intensa. El precipitado resultante se secó, se disolvió en agua, se ajustó el pH a 8,5, y se esterilizó en filtro con un filtro de 0,2  $\mu$ M. Para confirmar que toda la DVL se había saponificado, se realizó análisis de la solución salina en un HPLC Waters Alliance.

Se ensayaron diferentes combinaciones de genes de CoA transferasa/sintetasa y PHA sintasa para encontrar la mejor combinación adecuada para la producción de P(5HV). Las CoA transferasas/sintetasas ensayadas fueron *orfZ* de *C. kluyveri* y *alkK* de *P. oleovorans*, y las PHA sintetasas fueron *phaC* de *R. eutropha* y *phaEC* de *T. pfenigii* (Tabla 1A). Todas las cepas utilizadas en este experimento procedían de MG1655 (Jensen, J. Bacteriol, 175(11): 3401-3407 (1993)). Se construyeron cuatro plásmidos de expresión (pFS92, pMS96, pMS93 y pMS102), cada uno de ellos conteniendo diferentes combinaciones de CoA transferasa/sintetasa y PHA sintasa, como se describe en los siguientes párrafos.

#### **Construcción de plásmidos**

El plásmido pFS30 se construyó por digestión de pAET41 (Peoples y Sinskey, J. Biol. Chem. 264(26): 15298-15303 (1989)) con XmaI y StuI para eliminar un fragmento que contenía *phaC* de *R. eutropha* y su promotor nativo ( $P_{Re}$ ). El plásmido pAET41 es un vector pUC18 (N.º de registro L08752) que contiene un fragmento de cromosoma de H16 de *R. eutropha* que incluye el gen *phaC*. El plásmido pFS16 (Skraly y Peoples, Patente de Estados Unidos N.º 6.323.010), que es un derivado de pTrc99a (Pharmacia, Uppsala, Suecia) que contiene el gen *orfZ* de *C. kluyveri* (Tabla 1A) bajo el promotor  $P_{Re}$ , se digirió con BamHI, se enromó con T4 polimerasa, y se digirió una segunda vez con XmnI antes del ligamiento con el fragmento  $P_{Re}$ -*phaC* XmaI-StuI. El plásmido resultante se denominó pFS30 y contenía la fusión de *phaC*-operón *orfZ* bajo el promotor  $P_{Re}$  expresado de manera constitutiva.

El plásmido pFS92 se creó en un procedimiento multietapa. Primero, *phaE* de *T. pfenigii* se amplificó de pMON25893 (Reiser y col., Appl. Microbiol. Biotechnol. 53(2): 209-218 (2000)) con cebadores FS-E5' y FS-E3', que

contenían sitios de restricción EcoRI y Acc65I modificados genéticamente. El producto PCR *phaE* se digirió después con enzimas de restricción EcoRI y Acc65I y se ligaron con pTrcN digerido de manera similar (Gerngross y col., Biochemistry 33:9311-9320 (1994)) para formar pFS89. La secuencia del cebador para FS-E5' es (5')-GGAATTCAGGAGGTTTTATGAACGATACGGCCAACAAGACCAGC (SEQ ID NO: 1) y la secuencia del cebador para FS-E3' es (5')-GGGGTACCTCACTGGCCGGTGGTGGCTTGGTGGTCTTGCGGCG (SEQ ID NO: 2). A continuación, *phaC* de *T. pfenigii* se amplificó de pMON25894 (Reiser y col., Appl. Microbiol. Biotechnol. 53(2): 209-218 (2000)) con los cebadores FS-C5' y FS-C3', que contenían sitios de restricción Acc65I y BamHI modificados genéticamente. Después, el producto de PCR *phaC* se sometió a digestión con las enzimas de restricción Acc65I y BamHI y se ligó con pTrcN digerido de manera similar para formar pFS90. La secuencia del cebador para FS-C5' es (5')-GGGGTACCAGGAGGTTTTATGTCCCCATTCCCGATCGACATCCG (SEQ ID NO: 3) y secuencia del cebador para FS-C3' es (5')-CGGGATCCTCAGCCGCGTTCGTTCCAGCCAGCGCCGATCGCCG (SEQ ID NO: 4). Después, *phaE* y *phaC* de *T. pfenigii* se clonaron individualmente en pTrcN para formar pFS89 y pFS90, respectivamente, *phaE* se clonó corriente arriba de *phaC* por digestión de pFS89 con MluI y Acc65I, aislando el fragmento que contenía *phaE*, y ligándolo con una preparación de pFS90 digerida de manera similar. El plásmido resultante, pFS91, contenía la fusión operón *phaEC* bajo el promotor  $P_{Trc}$ . Finalmente, se creó pFS92 ligando un fragmento MluI-BamHI de pFS91 que contenía *phaEC* con pFS16 que se había digerido con MluI y BamHI. El plásmido pFS92 contiene la fusión de operón *phaEC-orfZ* bajo el promotor  $P_{Trc}$ .

El plásmido pMS96 se creó clonando *alkK* (véase la Tabla 1A) en pFS91 corriente abajo de *phaEC*. Primero, *alkK* se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de *P. oleovorans* utilizando los cebadores K5-1 y K3-1, que se modificaron genéticamente para incorporar los sitios BamHI sobre los extremos del producto de la PCR. La secuencia para el cebador K5-1 es (5')-GCTGAGGATCCAGGAGGTTTTATGTTAGGTCAGATGATGCGTAATC (SEQ ID NO: 5) y la secuencia para el cebador K3-1 es (5')-CTAGAGGATCCTTATTCACAGACAGAAGAAGACTACTG (SEQ ID NO: 6). Después de la amplificación, el fragmento PCR *alkK* y pFS91 (descritos en el párrafo anterior) se digirieron con BamHI y se ligaron para formar pMS96. Se verificó que la orientación de *alkK* en pMS96 estaba en la misma dirección que *phaEC* por digestión con enzimas de restricción, garantizando de este modo la construcción adecuada de una fusión de operón *phaEC-alkK* bajo el promotor  $P_{Trc}$ .

Los plásmidos pMS93 y pMS102 se construyeron dirigiendo primero pACYC177 (N.º de registro X06402) con BspHI para eliminar el marcador *kan* y ligarlo en el único sitio BspHI de pFS30 para formar pFS73, que contenía *phaC-orfZ* bajo el control de promotores en tándem  $P_{Trc}$  y  $P_{Re}$ . La región del promotor  $P_{Re}$  se eliminó reemplazando el fragmento EcoRI-BspEI de pFS73 que contenía tanto  $P_{Re}$  como 837 pb desde el extremo 5' de *phaC* CDS con un fragmento EcoRI-BspEI de pKAS4 (Peoples y col., Patente de Estados Unidos N.º 5.480.794) que solo contenía los 837 pb desde el extremo 5' de *phaC*. Este plásmido resultante, que contenía *phaC-orfZ* solo bajo el promotor  $P_{Trc}$ , se denominó pMS93. Para crear pMS102, el gen *orfZ* se eliminó de pFS73 por digestión con DraI y se autoligó con la estructura del plásmido para formar pMS74. El gen *alkK* se amplificó por PCR del plásmido pTrcN-A.eut-AlkK (descrito más adelante) utilizando los cebadores K5-2 y K3-2. La secuencia para el cebador K5-2 es (5')-AATTCAGGAGGTTTTATGTTAGGTCAGATGATGCGTAATC (SEQ ID NO: 7) y la secuencia para el cebador K3-2 es (5')-GATCCTTATTCACAGACAGAAGAAGACTACTG (SEQ ID NO: 8). Después, el plásmido pMS74 se digirió con SbfI y los extremos se enromaron con relleno Klenow y el fragmento de PCR *alkK* se ligó a la estructura pMS74 enromada para formar pMS92. El plásmido pMS92 contenía por tanto la fusión del operón *phaC-alkK* bajo el control de los promotores en tándem  $P_{Trc}$  y  $P_{Re}$ . Para expresar el operón exclusivamente a partir del promotor  $P_{Trc}$  inducible por IPTG, la región del promotor  $P_{Re}$  se eliminó reemplazando el fragmento EcoRI-BspEI de pMS92 que contenía tanto  $P_{Re}$  como los 837 pb del extremo 5' de *phaC* CDS, con un fragmento EcoRI-BspEI de pMS93 que contenía solo los 837 pb del extremo 5' de *phaC*. Este plásmido resultante, que contenía *phaC-alkK* solo bajo el promotor  $P_{Trc}$ , se denominó pMS102.

El plásmido pTrcN-A.eut-AlkK se creó amplificando primero por PCR *alkK* a partir de ADN genómico de *P. oleovorans* utilizando los cebadores Posynrbs.c (5')-GGAATTCAGGAGGTTTTATGTTAGGTCAGATGATGCGTAATCAG (SEQ ID NO: 9) y Posynrbs.r (5')-CGGGATCCTTATTCACAGACAGAAGAAGACTACTGCG (SEQ ID NO: 10). El producto resultante de la PCR se digirió con EcoRI y BamHI y se ligó con pTrcN digerido de manera similar para crear pTrcN-AlkK. El promotor  $P_{Re}$  se amplificó después por PCR a partir de ADN genómico de *Ralstonia eutropha* utilizando los cebadores A.eut.PhaG.c (5')-GGAATTCGGATCCCAAGTACCTTGCCGACATCTATGCGCTGGC (SEQ ID NO: 11) y A.eut.EcoRI.r (5')-GGAATTCCTGGCTCCGGGATTGCCCTGGCCGGACT (SEQ ID NO: 12). El producto resultante de la PCR se digirió con EcoRI y se ligó con pTrcN-AlkK digerido de manera similar para crear pTrcN-A.eut-AlkK.

Los plásmidos pFS92, pMS96, pMS93 y pMS102 se transformaron individualmente en MG1655 (Jensen, J. Bacteriol. 175(11): 3401-3407 (1993)) para crear cuatro cepas portadoras de plásmido que contenían diferentes combinaciones de CoA transferasa/sintetasa (*orfZ* o *alkK*) y PHA sintasa (*phaC* o *phaEC*). Estas cepas se cultivaron en matraces agitadores de 250 ml para caracterizar la producción del homopolímero P(5HV), como se describe en la siguiente sección.

#### **Medios, condiciones de cultivo y ensayo para la producción de homopolímero P(5HV) en cultivos con matraces agitadores**

Cada cepa MG1655 portadora de plásmido se cultivó durante una noche en un tubo de ensayo que contenía LB 3 ml

(Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (2001)) complementado con antibiótico apropiado a 37 °C con agitación a 250 rpm. Los antibióticos apropiados para cada cepa eran los siguientes: a cultivos durante una noche de cepas de MG1655, portadoras de pFS92 y pMS96, se añadió ampicilina 100 µg/ml; y a cultivos durante una noche de cepas MG1655, portadoras de pMS93 y pMS102, se añadió Km 50 µg/ml. Al día siguiente, 0,5 ml de cada cultivo durante una noche se utilizaron para inocular un matraz agitador que contenía 50 ml de LB reciente complementado con el antibiótico apropiado y se cultivó a 37 °C con agitación a 250 rpm. Al cabo de 3,5 horas, se añadió IPTG 0,1 mM a los cultivos líquidos, y a las 5 horas, el cultivo se centrifugó a 4150 rpm (centrífuga de sobremesa Sorvall Legend RT) y se resuspendió en 50 ml de medio de producción que contenía IPTG 0,1 mM y el mismo antibiótico. El medio de producción consistía en solución de sales mínima 1x E2 que contenía glucosa 10 g/l, LB 2,5 g/l, Na5HV 10 g/l, MgSO<sub>4</sub> 2 mM y solución de sales traza 1x. La solución de reserva 50x E2 consistía en NaNH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 1,275 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,643 M y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,36 M. La solución de reserva de sales traza 1000x se preparó añadiendo por 1 l de HCL 1,5 N: FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 50 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 11 g, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 2,5 g, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo7O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0,5 g, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 0,1 g y CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10 g.

Los cultivos resuspendidos se transfirieron a matraces agitadores de 250 ml y se incubaron a 30 °C durante 24 a 72 horas con agitación. Al final del experimento, los cultivos se centrifugaron a 4150 rpm, se lavaron una vez con agua destilada, se congelaron a -80 °C durante al menos 30 minutos y se liofilizaron durante una noche. Al día siguiente, una cantidad medida de sedimento celular liofilizado se añadió a un tubo de vidrio, seguido de 3 ml de reactivo de butanolisis que consistía en una mezcla del mismo volumen de n-butanol al 99,9 % y HCl 4,0 N en dioxano con difenilmetano 2 mg/ml como patrón interno. Después de taponar los tubos, se sometieron a agitación vorticial brevemente y se colocaron en un bloque térmico ajustado a 93 °C durante seis horas con agitación vorticial periódica. Después de esto, el tubo se enfrió a temperatura ambiente antes de añadir 3 ml de agua destilada. El tubo se sometió a agitación vorticial durante aproximadamente 10 s antes de centrifugar a 620 rpm (centrífuga de sobremesa Sorvall Legend RT) durante 2 min. Después, 1 ml de la fase orgánica se transfirió con pipeta a un vial de GC, que después se analizó por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) (Hewlett Packard 5890 Series II). La cantidad de homopolímero P(5HV) en el sedimento celular se determinó comparando frente a curvas patrón que se crearon añadiendo cantidades definidas de DVL en reacciones de butanolisis distintas. Para crear las curvas patrón, se utilizaron tres patrones de DVL de 2-6 mg.

#### Resultados experimentales

La Tabla 2 muestra que todas las construcciones podían generar P(5HV). Sin embargo, MG1655 [pMS93] generó significativamente más P(5HV) que cualquiera de las otras cepas, lo que demostraba que la combinación génica óptima para polimerizar P(5HV) era *phaC* y *orfZ*.

**Tabla 2.** Producción de homopolímero P(5HV)

Cepa [Plásmido]	Genotipo relevante	P(5HV) (% dcw)
MG1655 [pMS93]	<i>P<sub>trc</sub>-phaC-orfZ</i>	54,6
MG1655 [pFS92]	<i>P<sub>trc</sub>-phaEC-orfZ</i>	5,7 ± 1,2
MG1655 [pMS96]	<i>P<sub>trc</sub>-phaEC-alkK</i>	3,82
MG1655 [pMS102]	<i>P<sub>trc</sub>-phaC-alkK</i>	35,2

#### Ejemplo 2: Biosíntesis de copolímero P(3HB-co-5HV) a partir de 5-hidroxivalerato de sodio

El siguiente experimento era demostrar la producción de copolímero P(3HB-co-5HV) en una cepa de *E. coli* capaz de sintetizar los monómeros 3HB-coA y 5HV-CoA y su incorporación en PHA.

#### Construcción de la cepa

La cepa que se utilizó en este experimento fue MBX2641, que es un derivado de MG1655 que contiene un operón que consiste en *phaB-kan* de *B. megaterium* - *bktB-B* de *R. eutropha* H16 integrado al azar en el cromosoma. Para realizar la integración del operón, la cepa S17-1λ<sub>pir</sub> (Miller y Mekalanos, J. Bacteriol. 170(6): 2575-2583 (1988)) que contenía pCJ022 (descrita más adelante) se emparejó con MBX1987, que es un mutante de MG1655 resistente al ácido nalidíxico, utilizando un protocolo extraído de la bibliografía (De Lorenzo y Timmis, Methods Enzymol. 235: 386-405 (1994)). Derivados de MBX1987, que llevaban el casete *bktB-phaB-kan* en el cromosoma, se seleccionaron en placas con LB que contenían ácido nalidíxico (NI) 30 µg/ml y kanamicina (Km) 50 µg/ml. Un integrante de este tipo, que mostraba un fenotipo NI<sup>R</sup> Km<sup>R</sup> se guardó como MBX2079. Después, *phaEC-cat* se integró al azar en el cromosoma de MBX2079 emparejando con una cepa S17-1λ<sub>pir</sub> que llevaba el vector de integración pUT-C16-cat (descrito más adelante). Integrantes de MBX2079, que llevaban el casete *phaEC-cat* en el cromosoma, se seleccionaron en placas con LB que contenía cloranfenicol (Cm) 25 µg/ml. Diversos integrantes que poseían el fenotipo NI<sup>R</sup> Km<sup>R</sup> Cm<sup>R</sup> se agruparon y sometieron a mutagénesis con nitrosoguanidina (Miller, Experiments in

Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory (1972)) con selección en placas con LB que contenía Cm 100 µg/ml. Se aisló un mutante y se denominó MBX2114. Finalmente, se creó MBX2641 creando un lisado P1 en MBX2114 y transluciéndolo en MG1655, como describe Miller (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory (1972)) utilizando Km<sup>R</sup> como selección. Un transductante de este tipo se guardó y se denominó MBX2751, que es MG1655 con el casete génico *bktB-phaB-kan* integrado al azar en el genoma.

Los plásmidos pFS92 (véase el Ejemplo 1) y pJB84 (construcción descrita más adelante), se transformaron individualmente en MBX2741 que contenía *bktB-phaB-kan* integrado al azar en el cromosoma.

### Construcción del plásmido

El plásmido pCJ022 se generó creando un vector de integración mini-Tn5 que contenía *bktB-phaB* corriente arriba de un marcador *kan*. Para ello, el operón *bktB-phaB* se ensambló en pSE380 Invitrogen, Carlsbad, CA) amplificando primero por PCR *bktB* con los cebadores MS069 y MS070 a partir de pMON25765 (Slater y col., J. Bacteriol. 180(8): 1979-1987 (1998)). La secuencia para el cebador MS069 es (5')-GGTGGATCCTTAAGAGGAGGTTTTTATGACGCGTGAAGTGGTAGT GG (SEQ ID NO: 13) y la secuencia para el cebador MS070 es (5')-GGTGCCTAGCTCAGATACGCTCGAAGATGGCG (SEQ ID NO: 14). El fragmento resultante de la PCR se digirió con BamHI y NheI y se ligó con pSE380 que se había cortado con las mismas enzimas. El plásmido resultante se denominó pSE380-bktB. A continuación, *phaB* se amplificó por PCR a partir de pGM10 (McCool y Cannon, J. Bacteriol. 181(2): 585-592 (1999)) con los cebadores MS071 y MS072. La secuencia para el cebador MS071 es (5')-GGTCCTAGGTTAAGAGGAGGTTTTTATGACAACATTACAAGGTAA AG (SEQ ID NO: 15) y la secuencia para el cebador MS072 es (5')-GGTGC GGCCGCTTACATGTATAAGCCGCGTTAAT (SEQ ID NO: 16). El fragmento resultante de la PCR se digirió con AvrII y NotI y se ligó con pSE380-bktB que se había tratado con las mismas enzimas. El plásmido resultante se denominó pSE380-bktBphaB19. Después de haber ensamblado el operón, este se transfirió a pTrcN-*kan* (un derivado de pTrcN que tenía reemplazado el gen *bla* con el gen *kan*) por digestión de pSE380-bktBphaB19 con EcoRI y SpeI y ligando el fragmento que contenía *bktB-phaB* con pTrcN-*kan* que se había cortado con EcoRI y XbaI. El plásmido resultante se denominó pMS115. Después, el operón *bktB-phaB* se transfirió de pMS115 al vector de integración pBSL118 (Alexeyev y col., Can. J Microbiol. 41: 1053-1055 (1995)) por digestión de pMS115 y pBSL118 con BamHI y ligándolos entre sí para la producción del plásmido pCJ022, que se utilizó para integrar *bktB-phaB* en el cromosoma de MG1655.

El plásmido pUT-C16cat se generó eliminando *phaEC* de pFS91 con EcoRI y XbaI y enromando los extremos cohesivos usando Klenow. El vector de integración pUT-cat (De Lorenzo y Timmis, Methods Enzymol. 235: 386-405 (1994)) se digirió con AvrII, se enromó usando relleno Klenow y después se ligó con el fragmento *phaEC*. Después de verificar que *PhaEC* tenía la misma orientación que el marcador *cat* corriente abajo, el plásmido se denominó pUT-C16cat.

El plásmido pJB84 se construyó amplificando por PCR el marcador *aacC* (Gm<sup>R</sup>) a partir de pBSL202 (Alexeyev y col., Can. J. Microbiol. 41: 1053-1055 (1995)) utilizando los cebadores JB12b y JB124a, que se modificaron genéticamente para incluir los sitios BspHI, en los extremos flanqueantes 5'. La secuencia para el cebador JB123b es (5')-TTATTTTCATGAACCCTCGAATTGACGCGCTC (SEQ ID NO: 17) y la secuencia para el cebador JB124a es (5')-TTATTTTCATGAGCTTATCGATACCGTGCACC (SEQ ID NO: 18). El fragmento resultante de la PCR, que contenía el gen *aacC*, se digirió con BspHI y se ligó con pMS93 que se había digerido con la misma enzima para formar pJB84. Obsérvese que esta última etapa se realizó para reemplazar el marcador *bla* (Ap<sup>R</sup>) original en pMS93 por *aacC* (Gm<sup>R</sup>) en la misma orientación.

### Resultados experimentales

Las cepas MBX2641, que llevaban los plásmidos pFS92 (descrito en el Ejemplo 1) o pJB84, se cultivaron y prepararon para análisis con GC-FID, como se describe en el Ejemplo 1. Como se muestra en la Tabla 3, MBX2641 [pJB84] generó más copolímero (69,5 % dcw) e incorporó más 5HV en el copolímero (82,3 % de PHA).

Tabla 3. Producción de P(3HB-co-5HV)

Cepa [Plásmido]	Genes relevantes expresados	PHA Total (% dcw)	Incorporación de 3HB (% PHA)	Incorporación de 5HV (% PHA)
MBX2641 [pFS92]	<i>bktB-phaB; phaEC-orfZ</i>	7,8	46	54
MBX2641 [pJB84]	<i>bktB-phaB; phaC-orfZ</i>	69,5	18	82

**Ejemplo 3: Composición de monómero 5HV ajustable en copolímero P(3HB-co-5HV) y efectos sobre propiedades materiales**

La composición copolimérica se moduló alterando las cantidades de Na5HV y de glucosa añadidas al medio de producción. Como medios alternativos para realizar esto se incluyen (1) el suministro de diferentes cantidades de L-lisina al medio de cultivo para que una célula recombinante pueda producir 5HV a partir de L-lisina como se muestra en el Ejemplo 6, o (2) la desregularización de genes de la ruta de L-lisina en células recombinantes que pueden producir 5HV a partir de glucosa mediante L-lisina, como se muestra en los Ejemplos 9 y 10.

Para demostrar la composición de monómero 5HV ajustable en el copolímero P(3HB-co-5HV), se utilizó la cepa MBX2641 [pFS30] que expresaba las enzimas para la ruta de 3HB (*bktB* y *phaB*) además de la CoA-transferasa (*orfZ*) y la PHA sintasa (*phaC*). Cultivos paralelos de MBX2641 [pFS30] se cultivaron en concentraciones decrecientes de glucosa (10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0 g/l) o bien de Na5HV (10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0 g/l) y se analizó el contenido de polímero como se describe en el Ejemplo 1. La Tabla 4 muestra que en el copolímero P(3HB-co-5HV) pueden incorporarse varias cantidades de 5HV.

**Tabla 4.** Efecto del suministro conjunto sobre la incorporación de 5HV en P(3HB-co-5HV)

Suministro de glucosa (g/l)	Suministro de Na5HV (g/l)	PHA Total (% dcw)	Incorporación de 5HV (% PHA)
10	10	42,5 ± 4,6	50,0 ± 3,4
10	5	29,1	42,3
10	1	19,1	22,9
10	0,5	27,2	16,3
10	0,1	22,3	5,0
10	0	14,8	2,5
5	10	27,6	51,4
1	10	12,7	45,2
0,5	10	8,9	38,3
0,1	10	6,5	35,1
0	10	6,9	29,6

En otro experimento, se generó un total de 10 muestras de copolímero P(3HB-co-5HV) con una gran variedad de composiciones de 5HV y después se extrajeron para análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC, *differential scanning calorimetry*). La Tabla 5 muestra que, a medida que aumenta el porcentaje de la composición de 5HV en el copolímero P(3HB-co-5HV), la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) disminuye. Esto demuestra que modulando la composición comonomérica de 5HV puede obtenerse una gran variedad de propiedades materiales.

**Tabla 5.** Propiedades materiales de polímeros extraídos

Cepa / Origen	Procedimiento	% 5HV	T <sub>g</sub> (°C)
MBX648 [pMS93]	Matraz agitador	100	<b>-58</b>
MBX2641 [pJB84]	Matraz agitador	82	<b>-49</b>
MBX2641 [pFS30]	Matraz agitador	52	<b>-34</b>
MBX2641 [pFS30]	Matraz agitador	49	<b>-29</b>
MBX2641 [pFS30]	Matraz agitador	47	<b>-27</b>
MBX2114 [pFS30]	Matraz agitador	39	<b>-30</b>

(continuación)

Cepa / Origen	Procedimiento	% 5HV	Tg (°C)
MBX2641 [pF830]	Matraz agitador	39	-24
MBX2641 [pFS30]	Matraz agitador	23	-16
MBX2641 [pFS30]	Matraz agitador	16	-9
MBX2641 [pFS30]	Matraz agitador	5	0

#### Ejemplo 4: Síntesis de 3-hidroxipropionato a partir de Na5HV mediante el sistema de degradación de ácidos grasos

- 5 Para determinar si el sistema de degradación de ácidos grasos (FAD, *fatty acid degradation*) de *E. coli* es capaz de descomponer 5HV en acetil-Coa y 3-hidroxipropionil-CoA (3HP-CoA), el plásmido pMS93 (que expresaba *phaC-orfZ* de un promotor  $P_{trc}$ ; véase el Ejemplo 1) se transformó en cepas K12 de *E. coli* que eran *fadR*<sup>+</sup>, *atoC*<sup>+</sup> (FAD reprimido) o *fadR*<sup>-</sup>, *atoC*<sub>const</sub> (FAD desreprimido). Se utilizaron MG1655 y LS5218 (Spratt y col., J. Bacteriol. 146(3): 1166-1169 (1981)) como las cepas *fadR*<sup>+</sup>, *atoC*<sup>+</sup> y *fadR*<sup>-</sup>, *atoC*<sub>const</sub>, respectivamente. MG1655 [pMS93] y LS5218 [pMS93] se ensayaron suministrando Na5HV en matraces agitadores, como se describe en el Ejemplo 1. Los análisis con GC-FID y Espectroscopía de Masas (EM) demostraron que LS5218 [pMS93] producía P(5HV-co-3HP), mientras que MG1655 [pMS93] no lo producía (Tabla 6). Esto demuestra que la degradación de ácidos grasos activa produciría 3HP a partir de 5HV.

Tabla 6. Incorporación de 3HP en P(5HV-co-3HP)

Cepa [Plásmido]	Genotipo relevante	PHA Total (% dcw)	Incorporación de 5HV (% PHA)	Incorporación de 3HP (% PHA)
MG1655 [pMS93]	<i>fadR</i> <sup>+</sup> , <i>atoC</i> <sup>+</sup>	63,1	100	0
LS5218 [pMS93]	<i>fadR</i> <sup>-</sup> , <i>atoC</i> <sub>const</sub>	6,4	52	48

15

#### Ejemplo 5: Biosíntesis de homopolímero P(5HV) a partir de L-lisina

- El diagrama esquemático de la ruta concebida para convertir L-lisina en P(5HV) se representa en la Figura 2B y requiere seis genes heterólogos a clonar y expresar en *E. coli*: *davB* de *P. putida*, *davA* de *P. putida*, *davT* de *P. putida*, *gsaR*<sub>Ar</sub> de *A. thaliana*, *orfZ* de *C. kluyveri* y *phaC* de *R. eutropha* (véase la Tabla 1A). Se diseñó una estrategia de clonación de tal manera que los genes *davBAT* pudiesen clonarse en pACYC184 (Chang y Cohen, J. Bacteriol. 134: 1141-1156 (1978)) y *gsaR*<sub>Ar</sub>, *orfZ* y *phaC* pudiesen clonarse en pSE380. Estos plásmidos se denominaron pJB91 y pMZ28, respectivamente, y se ensamblan como se describe en el siguiente apartado.

20

#### Construcción de plásmidos

- El sitio de clonación múltiple del plásmido pSE380 se amplificó por PCR con los cebadores JB134 (5'-TGAGCGGATAACAATTTCAC) (SEQ ID NO: 19) y JB135 (5'-AATAACACGTCAACGCAAAAAGGCCATCCGT) (SEQ ID NO: 20). El producto resultante de la PCR se digirió con BmgBI y se clonó en el plásmido pACYC184 que se digirió con EcoRV y NruI para crear pJB78.

25

- El plásmido pJB91 se construyó en un procedimiento de tres etapas. Primero, los genes *davBA* de *P. putida* se amplificaron por PCR a partir de una preparación de ADN genómico utilizando los cebadores JB136 y JB137, que se modificaron genéticamente para incorporar los sitios de restricción NdeI y BsrGI, respectivamente, en los extremos 5' y 3' del producto de PCR *davBA*. La secuencia para el cebador JB136 es (5')-TTTTTCATATGAGGAGGTTTTTATGAACAAGAAGACCGCCA (SEQ ID NO: 21) y la secuencia para el cebador JB137 es (5')-TTTTTTGTACATCAGCCTTTACGCAGGTGCA (SEQ ID NO: 22). El producto resultante de la PCR se digirió con NdeI y BsrGI y se ligó con pJB78 que se había tratado con las mismas enzimas, para dar el plásmido pJB79. A continuación, el gen *davT* de *P. putida* se amplificó por PCR a partir de ADN genómico utilizando los cebadores JB138 y JB139, que se modificaron genéticamente para incorporar los sitios de restricción SpeI y ApaI, respectivamente, en los extremos 5' y 3' del producto de PCR *davT*. La secuencia para el cebador JB138 es (5')-TATATACTAGTAGGAGGATAATATGAGCAAACCAACGAATC (SEQ ID NO: 23) y la secuencia para el cebador JB139 es (5')-TTTTTGTGCACTCAGGCGATTTTCAGCGAAGC (SEQ ID NO: 24). El producto resultante de la PCR se digirió con SpeI y ApaI y se ligó con pJB79 que se había digerido con las mismas enzimas, creando de este modo el plásmido pJB80. Finalmente, el promotor *ompA* se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de K12 de *E. coli*

35

40

- utilizando los cebadores JB141 y JB142, que se modificaron genéticamente para incorporar los sitios de restricción BmgBI y AseI, respectivamente, en los extremos 5' y 3'. El producto resultante de la PCR se digirió con BmgBI y AseI y se ligó con pJB80 que se había digerido con SnaBI y NdeI para formar el plásmido pJB82. El plásmido pJB91 se construyó a través de digestión de un producto de PCR *davBA* creado con los cebadores JB136 y JB137 (como se ha descrito anteriormente), con DraIII y ligando el fragmento de 507 pb con pJB82 que se había digerido con la misma enzima, creando de este modo el plásmido pJB91. Esta construcción se realizó para corregir una mutación finalizadora (*nonsense*) que se había descubierto en *davB* CDS de pJB82. El plásmido pJB80 contiene el operón *davBAT* bajo el promotor constitutivo  $P_{tet}$ , mientras que el plásmido pJB91 contiene el mismo operón bajo el fuerte promotor  $P_{ompA}$ .
- El plásmido pMZ28 se construyó por digestión del plásmido pJ31:7950, que es una construcción creada por DNA 2.0 (Menlo Park, CA) y que contenía *gsaR<sub>At</sub>* que está optimizado con codones para la expresión en K12 de *E. coli*, con BsrGI. El fragmento resultante que contenía *gsaR<sub>At</sub>* se ligó con pFS30 que también se había cortado con BsrGI. Después de verificar que la orientación de *gsaR<sub>At</sub>* estaba en la misma dirección que *phaC-orfZ* por digestión con enzimas de restricción, el plásmido resultante se denominó pMZ28.

### 15 **Resultados experimentales**

- MG1655 [pMZ28] que expresa una L-lisina incompleta en la ruta de P(5HV) y MG1655 [pMZ28, pJB91] que expresa la L-lisina completa en la ruta de P(5HV), se inocularon en un tubo de ensayo que contenía LB 3 ml complementado con antibiótico apropiado (cloranfenicol 25 µg/ml para pJB91; ampicilina 100 µg/ml para pMZ28) y se cultivó durante una noche a 37 °C con agitación a 250 rpm. Al día siguiente, se utilizaron 0,5 ml de cada cultivo durante una noche para inocular un matraz agitador que contenía 50 ml de LB reciente complementado con el antibiótico o antibióticos apropiados, y se cultivó a 37 °C con agitación a 250 rpm. Al cabo de 3,5 horas, se añadió IPTG 0,1 mM a los cultivos líquidos, y a las 5 horas, los cultivos se centrifugaron a 4150 rpm (centrifuga de sobremesa Sorvall Legend RT) y se resuspendieron en 50 ml de medio de producción que consistía en una solución de sales mínima 1x E2 que contenía glucosa 10 g/l, LB 2,5 g/l, L-lisina 10 g/l, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, Solución de Sales Traza 1x e IPTG 0,1 mM. En el Ejemplo 1 se proporcionan las fórmulas de las sales E2 y de la Solución de Sales Traza.

Las condiciones de cultivo en matraz agitador y el protocolo de análisis para el contenido de PHA son como se describen en el Ejemplo 1. La Tabla 7 muestra que, después de la introducción del operón *davBAT*, se producía ocho veces más P(5HV).

**Tabla 7.** Producción de P(5HV) a partir de L-lisina

Cepa [Plásmido]	Genotipo relevante	PHA Total (% dcw)
MG1655 [pMZ28]	pMZ28: $P_{Trc}$ - <i>gsaR<sub>At</sub></i> - $P_{Re}$ - <i>phaC-orfZ</i>	0,01
MG1655 [pMZ28, pJB91]	pMZ28: $P_{Trc}$ - <i>gsaR<sub>At</sub></i> - $P_{Re}$ - <i>phaC-orfZ</i> pJB91: $P_{ompA}$ - <i>davBAT</i>	0,08

- Ejemplo 6: Biosíntesis de copolímero P(3HB-co-5HV) a partir de L-lisina**

La ruta concebida para convertir L-lisina en P(5HV) también se introdujo en la cepa MBX2641 que expresaba *bktB* y *phaB* para la producción del copolímero P(3HB-co-5HV) a partir de L-lisina y eventualmente glucosa.

#### **Construcción del plásmido**

- En este ejemplo, los genes comprendidos en la ruta incluyen: *davB* de *P. putida*, *davA* de *P. putida*, *davT* de *P. putida*, *orfZ* de *C. kluyveri*, *phaC* de *R. eutropha* y *gsaR<sub>At</sub>* de *A. thaliana* o *gsaR<sub>At2</sub>* de *A. terreus* (véase la Tabla 1A).

- El plásmido pJB90, que contiene una ruta alternativa que consiste en los genes *gsaR<sub>At2</sub>*, *phaC* y *orfZ*, se creó de la siguiente manera. El gen *gsaR<sub>At2</sub>* de *A. terreus*, optimizado con codones para la expresión en K12 de *E. coli*, se amplificó por PCR a partir de pSG40 (una construcción creada por DNA 2.0 (Menlo Park, CA)) utilizando los cebadores JB145 y JB146. Ambos cebadores contenían los sitios BglII en los extremos 5'. La secuencia para el cebador JB145 es (5')-TTTTTAGATCTAGGAGGTTTTTATGCTGCGTGCTGCTTCTCG (SEQ ID NO: 25) y la secuencia del cebador JB146 es (5')-TTTTTAGATCTTTAGCGAAATAGTTTGGAC (SEQ ID NO: 26). El fragmento resultante de la PCR se digirió con BglII y se ligó en el sitio de pJB84 correspondiente para crear pJB90.

#### **Resultados experimentales**

- Las cepas MBX2641 [pJB78, pJB84], MBX2641 [pJB91, pMZ28] y MBX2641 [pJB91, pJB90] se cultivaron en matraces agitadores y se analizaron con respecto al contenido y composición de PHA como se describe en los Ejemplos 1 y 2 para caracterizar la producción de P(3HB-co-5HV) a partir de L-lisina y glucosa. Las cepas MBX2641 [pJB78, pPB84], MBX2641 [pJB91, pMZ28] y MBX2641 [pJB91, pJB90] se inocularon en tubos de ensayo que

contenían LB 3 ml complementado con cloranfenicol 25 µg/ml y ampicilina 100 µg/ml y se cultivaron durante una noche a 37 °C con agitación a 250 rpm. Al día siguiente, 0,5 ml de cada cultivo durante una noche se utilizaron para inocular un matraz agitador que contenía 50 ml de LB reciente complementado con el mismo antibiótico y se cultivó a 37 °C con agitación a 250 rpm. Al cabo de 3,5 horas, se añadió IPTG 0,1 mM a los cultivos líquidos y a las 5 horas, los cultivos se centrifugaron a 4150 rpm (centrífuga de sobremesa Sorvall Legend RT) y se resuspendió en 50 ml de medio de producción que consistía en solución de sales mínimas 1 x E2 que contenía glucosa 10 g/l, LB 2,5 g/l, L-lisina 10 g/l, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, Solución de Sales Traza 1x e IPTG 0,1 mM. En el Ejemplo 1 se proporcionan las fórmulas de las sales E2 y de la Solución de Sales Traza.

Como se muestra en la Tabla 8, la cepa MBX2641 [pJB78, pJB84], que no tiene los genes que convierten L-lisina en 5HV, no pudo producir 5HV a partir de L-lisina y produjo solo homopolímero P(3HB). Las cepas MBX2641 [pJB91, pMZ28] y MBX2641 [pJB91, pJB90], ambas de las cuales contenían toda la ruta para dar 5HV-CoA a partir de L-lisina, incorporaron 5HV a 2,5 % en peso y 5 % en peso, respectivamente, del copolímero total. Esto demuestra que los genes *davBAT* y *gsaR* necesitan expresarse para la producción de copolímeros que contienen 5HV a partir de L-lisina.

**Tabla 8.** Producción de P(3HB-co-5HV) a partir de L-lisina

Cepa [Plásmido]	Genotipo de plásmido relevante		PHA Total (% dcw)	Incorporación de 3HB (% PHA)	Incorporación de 5HV (% PHA)
	<i>P<sub>ompA</sub>-davBAT</i>	<i>P<sub>Trc</sub>-phaCgsaR<sub>x</sub>-orfZ</i>			
MBX2641 [pJB78, pJB84]	ninguno	<i>P<sub>Trc</sub>-phaC-orfZ (sin gsaR<sub>x</sub>)</i>	38 ± 9	100	0
MBX2641 [pJB91, pMZ28]	Presente	<i>P<sub>Trc</sub>-phaCgsaR<sub>At</sub>-orfZ</i>	33 ± 11	97,5 ± 1,5	2,5 ± 1,5
MBX2641 [pJB91, pJB90]	Presente	<i>P<sub>Trc</sub>-phaCgsaR<sub>At2</sub>-orfZ</i>	41 ± 11	95,0 ± 2,3	5,0 ± 2,3

**Ejemplo 7: Biosíntesis mejorada de polímeros de PHA que contienen 5HV a partir de L-lisina**

Debido al hecho de que el 5HV se incorporó a un nivel inesperadamente bajo, se consideró la existencia de una ruta competidora. Para ver si a partir de L-lisina podía producirse glutarato, se cultivó MG1655 [pJB91], que expresaba los genes *davBAT* del plásmido, en medio LB que contenía cloranfenicol 25 mg/l a 30 °C con agitación durante 6 h. Se inocularon alícuotas de 25 µl de cultivos en fase semilogarítmica en medio mínimo E0 475 µl y se incubó a 30 °C con agitación a 250 rpm durante 48 h. El medio mínimo E0 consistía en glucosa 10 g/l, lisina 4 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 58 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 27 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, cloranfenicol 25 µg/ml, IPTG 0,1 mM y elementos traza. El glutarato, presente en el sobrenadante, se midió por GC-MS como indica más adelante: los sobrenadantes del caldo de fermentación se obtuvieron por centrifugación y 1 µl de la muestra se transfirió con pipeta a un tubo Eppendorf nuevo que contenía 1 µl de 4-aminobutirato (GABA) 1 g/l como patrón interno. Las muestras se secaron en un centrípag de Labconco y se resuspendieron en una solución 1:1 de acetonitrilo (ACN) 100 µl:N-(t-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA), por ultrasonido durante 3 h. Después, las muestras se derivatizaron a 65 °C durante 30 min, se centrifugaron para eliminar el material insoluble y los sobrenadantes se inyectaron en un GC-MS Agilent 5975 equipado con una columna HP-5ms utilizando los siguientes parámetros de adquisición: caudal de gas helio transportador 2 ml/min, modo de barrido m/z 65-700, retardo de disolvente durante 3,5 min, programa del horno: 150 °C durante 2 min, aumentando después a 280 °C a 3 °C/min, temperatura de la fuente de iones 230 °C y temperatura del filtro de masa de cuadrupolo a 150 °C.

Cabe destacar que, cuando el operón *davBAT* se sobreexpresa en MG1655, se producían 0,6 g/l de glutarato a partir de L-lisina. El operón *davBAT* expresa genes que codifican enzimas que convierten la L-lisina en GSA. El glutarato puede producirse mediante un gen de *E. coli* endógeno cuya enzima codificada puede oxidar GSA en glutarato.

La inspección de probables reacciones enzimáticas de GSA a glutarato, condujo a la identificación de dos genes GSA deshidrogenasa de *E. coli* posiblemente endógenos, *gabD* y/o *ynel* (véase la Tabla 1A). Anteriormente, se había identificado que estos dos genes oxidaban succínico semialdehído en ácido succínico (Dennis y Valentín, Patente de Estados Unidos N.º 6.117.658) pero no se había observado que oxidaran GSA en glutarato. Para comprobar si una cepa negativa a *ynel* y *gabD* aún producía glutarato a partir de L-lisina, se construyeron las siguientes cepas.

Se construyeron mutantes *gabD* y *ynel* nulos individuales mediante el procedimiento de recombinación genética Red/ET descrito por Datsenko y Wanner (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6640-6645 (2000)). El procedimiento de

eliminación de *gabD* del cromosoma de MG 1655 implicó el reemplazo de *gabD* con un marcador *kan* flanqueado por FRT mediante recombinación homóloga mediada por PCR. El marcador *kan* flanqueado por FRT se amplificó por PCR a partir del plásmido pKD4 (Datsenko y Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6640-6645 (2000)) utilizando los cebadores RF314 5'-GCAAGCCAGAGTAACCCCGGACGCACGCTGCGAGCGGCACGCTAGTGTGGATGCCTTACACGCCGCATTTAATC AATAACCTTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO: 27) y RF315 5'-GAATTTGCCCAACGCCACGGGAATCGCCTGACTGCGGCGCTGCATTAACTCTTTATTGCTGTTTCATTTCGCATTC TCCAGATGGGAATTAGCCATGGTCCATATGAATAT (SEQ ID NO: 28).

El gen *ynel* se eliminó del cromosoma de MG1655 por reemplazo con un marcador *kan* flanqueado por FRT. Este marcador se amplificó por PCR del plásmido pKD4 utilizando los cebadores MS220 5'-GCAAGAGTAAATCTGCGTATCTTCATACCATGACTCATAAAGGAGATACCCCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO: 29) y MS217 5'-ACCGCAGGTCTGAAAAGACCTGCGAGTATATCAGAGCTGAATATG TCGCGCATATGAATATCCTCCTTAGT (SEQ ID NO: 30) que introdujo regiones de homología flanqueadas de 50 pb en el gen a eliminar. El reemplazo de *ynel* con este fragmento de ADN no surtió efecto y, por tanto, se creó otro fragmento por PCR que tenía regiones de homología aumentadas para el reemplazo génico. Para lograr esto, se realizó una ronda adicional de PCR utilizando, como molde, el fragmento generado anteriormente por PCR y los cebadores MS223 5'-TCGATTTCGTGAATAAGTGGCTTAATATTATTCATTTAAAGCAAG AGTAAATCTGCGTATC (SEQ ID NO: 31) y MS224 5'-GCCACTTTCTACTCCTGGACCGCAGGTCTGAAAAGACCTGCGAGTATATCAGAGCTG (SEQ ID NO: 32). Se consiguió un reemplazo satisfactorio de *ynel* con FRT-*kan*-FRT. El marcador *kan* se eliminó después como se describen Datsenko y Wanner (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6640-6645 (2000)).

Por transducción mediada por P1 a partir de MG1655 $\Delta$ *gabD*::FRT-*kan*-FRT a MG1655 $\Delta$ *ynel*::FRT, se construyó MG1655  $\Delta$ *gabD*::FRT-*kan*-FRT,  $\Delta$ *ynel*::FRT y el marcador *kan* restante se eliminó adicionalmente utilizando el mismo procedimiento que el descrito anteriormente. La cepa resultante MG1655  $\Delta$ *gabD*::FRT,  $\Delta$ *ynel*::FRT se transformó con pJB91 y se analizó con respecto a la producción de glutarato a partir de L-lisina en un experimento análogo al descrito anteriormente con MG1655 [pJB91] que expresaba los genes *davBAT* a partir del plásmido.

A diferencia de MG1655 [pJB91] que producía 0,6 g/l de glutarato a partir de L-lisina, la cepa MG1655  $\Delta$ *gabD*::FRT,  $\Delta$ *ynel*::FRT [pJB91] no producía glutarato a partir de L-lisina, lo que demostraba que los genes *gabD* y/o *ynel* endógenos de *E. coli* eran responsables de la conversión de GSA en glutarato.

### 30 **Producción mejorada de copolímeros P(3HB-co-5HV) a partir de L-lisina**

La mejora del flujo de L-lisina a 5HV se realizó eliminando la GSA deshidrogenasa endógena que codifica los genes *gabD* e *ynel* en una cepa que produce el copolímero 3HB-co-5HV.

Se construyó MBX2855 transformando los plásmidos pJB91 y pJB90 en la cepa MBX2641. Esta cepa tiene todos los genes para la producción de (3HB-co-5HV) a partir de glucosa y L-lisina.

35 MG1655  $\Delta$ *gabD*::FRT,  $\Delta$ *ynel*::FRT se transdujo a P1 con la cepa donante MBX2114 que confería capacidades de producción de PHB como se describe en el Ejemplo 2. Esta cepa se transformó adicionalmente con pJB90 y pJB91, que expresaban la L-lisina en los genes de la ruta P(5HV) como se describe en los Ejemplos 6 y 5, respectivamente. La cepa resultante se denominó MBX3378 y tenía todos los genes para la producción de P(3HB-co-5HV) a partir de glucosa y L-lisina pero a diferencia de MBX2855 los dos genes, *gabD* e *ynel*, se había eliminado del genoma.

40 Utilizando la cepa MBX2855 y su homólogo MBX3378 deficiente en GSA deshidrogenasa, se realizó una fermentación en placa con agitación. Las células se incubaron y analizaron en las mismas condiciones que las descritas anteriormente (agitación a 300 rpm a 30 °C). El medio mínimo E0 consistía en glucosa 10 g/l, L-lisina 2 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 58 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 27 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, cloranfenicol 25 µg/ml, gentamicina 5 µg/ml, IPTG 0,1 mM, y elementos traza, como se describe en un ejemplo previo. El flujo de carbono de L-lisina a 5HV mejoró drásticamente en la cepa MBX3378 deficiente de GSA deshidrogenasa en comparación con MBX2855 que contenía actividad GSA deshidrogenasa de tipo silvestre como se muestra en la **Tabla 9**. Para mejorar significativamente la producción de PHA que contiene 5HV, es preciso eliminar los genes de GSA deshidrogenasa, tales como *gabD* e *ynel*, del genoma de los hospedadores de producción.

Tabla 9. Producción mejorada de P(3HB-co-5HV) a partir de L-lisina

Cepa [plásmido]	Genes relevantes expresados	Genes relevantes desactivados	PHA Total (% dcw)	Incorporación de 3HB (% PHA)	Incorporación de 5HV (% PHA)
MBX2855	<i>P<sub>ompA</sub>-davBAT, P<sub>Trc</sub>-phaCgsaR<sub>At2</sub>-orfZ</i>	ninguno	17,3	98,6	1,4
MBX3378	<i>P<sub>ompA</sub>-davBAT, P<sub>Trc</sub>-phaCgsaR<sub>At2</sub>-orfZ</i>	<i>gabD-1<sup>n</sup>, ynel</i>	24,7	64,9	35,1

### Ejemplo 8: Biosíntesis de L-lisina a partir de glucosa

La regulación por retroalimentación alostérica se produce en la ruta de L-lisina a través de los genes *lysC* y *dapA*. Por lo tanto, es necesario eliminar este control para permitir aumentar la producción de L-lisina a partir de glucosa. El procedimiento para esto está bien establecido y se ha descrito para los dos genes (Kojima y col., Patente de Estados Unidos N.º 6.040.160). Los mutantes de *E. coli* que poseen *lysC* y *dapA* desregularizados pueden obtenerse primero eliminando *metL* y *thrA* de *E. coli*. Las isozimas LysC, MetL y Thra catalizan la misma reacción aspartato quinasa, por tanto será necesario eliminar antes las dos últimas mutaciones en Lysc que pueden seleccionarse positivamente. Una vez creada la cepa  $\Delta metL \Delta thrA$ , esta puede mutarse con N-metil-N'-nitro-N-nitrosguanidina (NTG). El grupo mutante resultante podría después cultivarse en un medio mínimo que contiene S-2-aminoetilcisteína (AEC), un análogo no metabolizable de L-lisina, para poner presión sobre *lysC* y *dapA*. Dado que *metL* y *thrA* faltan, las únicas mutaciones que desensibilizan a *lysC* y *dapA* a L-lisina (o su análogo AEC) permitirán que la célula sintetice L-lisina, treonina y metionina y por tanto sobrevivirá. Pueden realizarse manipulaciones adicionales sobreexpresando *lysC* desregularizado, *dapA* desregularizado, y otros genes de la ruta a partir de un promotor recombinante para aumentar la capacidad de flujo y eliminar la regulación transcripcional.

### Ejemplo 9: Biosíntesis de homopolímero P(5HV) a partir de glucosa

A partir de glucosa como la única fuente de carbono, se produjo P(5HV) en la cepa *E. coli* capaz de sintetizar los monómeros 5HV-CoA de glucosa e incorporarlos en PHA. Para ello, se construyó una cepa que no solo expresaba los genes necesarios para la producción del homopolímero P(5HV) a partir de L-lisina, sino que también expresaba un gen *dapA* mutado denominado *dapA<sup>fb</sup>* que codifica una dihidrodipicolinato sintasa resistente a retroalimentación por L-lisina. La primera parte de este ejemplo describirá la construcción de los plásmidos necesarios para demostrar esta capacidad.

#### Construcción de los plásmidos

En *E. coli*, la regulación alostérica se produce en la ruta de L-lisina a través de la aspartato quinasa III y la dihidrodipicolinato sintasa codificadas por los genes *lysC* y *dapA*, respectivamente (Figura 6). Para aumentar la producción de L-lisina y eventualmente del homopolímero P(5HV) a partir de glucosa, la regulación alostérica debe reducirse o eliminarse por completo. El procedimiento para hacer esto está muy establecido y se ha descrito para ambos genes (Kojima y col., Patente de Estados Unidos N.º 6.040.160). Se construyó un gen *dapA<sup>fb</sup>* resistente a retroalimentación por L-lisina, que tenía el resto de nucleótido 352 de citosina cambiado por timina (*dapA<sup>C352T</sup>*). Esto se obtuvo por amplificación con PCR del gen *dapA* de *E. coli* cromosómico generando dos fragmentos de ADN, utilizando cebadores que introducen el cambio de bases deseado, seguido de corte y empalme mediante PCR con extensión solapada (SOE-PCR, *splicing by overlap extension PCR*) para fusionar los dos fragmentos de ADN. El procedimiento SOE-PCR se ha descrito anteriormente (Ho y col., Gene 77(1): 51-9 (1989). Con detalle, un fragmento de ADN que contenía los pares de nucleótidos 1 a 366 del gen *dapA*, se amplificó con los cebadores DE081 (5'-AAAAGAATTCTTAATTAATTCTAGAAGGAGGTTTCATATGTTCCACGGGAAGTATT GTC) (SEQ ID NO: 33) y DE082 (5'-AGCGATGGCTTTGAAATACTGATACAAACCTTC) (SEQ ID NO: 34) y el otro fragmento de ADN que contenía los pares de nucleótidos 337 a 879 de *dapA* se amplificó con los cebadores DE083 (5'-GAAGGTTTGATCAGTATTTCAAAGCCATCGCT) (SEQ ID NO: 35) y DE084 (5'-CCCGAGCTCGTTTAACTTAATTAAGACTAGTTTTACAGCAAACCGGCATGCTT) (SEQ ID NO: 36). Los cebadores DE082 y DE083 son complementarios inversos y se diseñaron para introducir el cambio de bases de citosina por timina en el resto de nucleótido 352. Los dos fragmentos de ADN de la primera ronda de PCR se fusionaron mediante SOE-PCR utilizando los cebadores DE081 y DE084. El producto resultante de la PCR se digirió con XbaI y SacI y se ligó con pDE031 que se había dirigido con SpeI y SacI, creando de este modo el plásmido pDE035. El plásmido pDE031, que contenía un promotor constitutivo sintético (*P<sub>synI</sub>*) se construyó digiriendo un fragmento de ADN bicatenario de 63 pb sintetizado (5'-TTTTTCTAGATTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCA CTAGTGTTTAAACCCCC) (SEQ ID NO: 37) con XbaI y PmeI y se ligó en los mismos sitios de enzimas de restricción de un plásmido pBluescript II SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA) que previamente se había modificado por ingeniería genética para contener estos sitios. La construcción del gen *P<sub>synI</sub>-dapA<sup>C352T</sup>* en pDE035 se digirió con XhoI y PmeI, que fue seguido de ligamiento con el

plásmido pJB90 (descrito en el Ejemplo 6) que se había digerido con BsrGI, enromado con nucleasa de judía Mung y digerido una segunda vez con XhoI para generar el plásmido pJG22 que expresaba el operón *phaC-gsaR<sub>At</sub>-orfZ* a partir del promotor P<sub>tre</sub> y el gen *dapA*<sup>C352T</sup> a partir del promotor P<sub>synl</sub>.

### Resultados experimentales

- 5 El plásmido pJG22 se transformó junto con los plásmidos pJB91 (descrito en el Ejemplo 5) en la cepa MBX3342 (MG1655  $\Delta$ *gabD*::FRT  $\Delta$ *yneI*::FRT) para formar la cepa MBX3342 [pJB91, pJG22]. Los plásmidos pSE380 y pACYC184, los vectores vacíos utilizados para construir pJG22 y pJB91, respectivamente, también se transformaron en la cepa MBX3342 para crear la cepa de control negativo MBX3342 [pSE380, pACYC184]. Estas cepas se incubaron durante 48 h agitando a 300 rpm a 30 °C en medio E2 2x y se analizó como se describe en los ejemplos anteriores. El medio consistía en glucosa 15 g/l, NaNH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub> 52 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 66 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 54 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, IPTG 0,1 mM y elementos traza, como se describe anteriormente. Para los medios de cultivo de MBX3342 [pJB91, pJG22], se complementó cloranfenicol 25 µg/ml y gentamicina 5 µg/ml, mientras que se añadieron cloranfenicol 25 µg/ml y ampicilina 100 µg/ml para MBX3342 [pSE380, pACYC184]. Los datos de la Tabla 10 muestran que MBX3342 [pJB9, pJG22] produjo homopolímero P(5HV) con un peso seco celular (DCW) de 2,60 %, mientras que la cepa MBX3342 [pSE380, pACYC184] no produjo ningún PHA. Estos resultados demuestran que una cepa que expresa el gen *dapA* resistente a retroalimentación además de los genes de la ruta de L-lisina a P(5HV), pueden producir P(5HV) a partir de glucosa como una única fuente de carbono.

**Tabla 10.** Producción de P(5HV) a partir de glucosa

Cepa [Plásmido]	Genotipo del plásmido relevante	PHA Total (% dcw)
MBX3342 [pSE380, pACYC184]	pSE380: control de vector vacío pACYC184: control de vector vacío	0,0
MBX3342 [pJG22, pJB91]	pJG22: P <sub>Tre</sub> - <i>phaC-gsaR<sub>At</sub>-orfZ</i> P <sub>synl</sub> - <i>dapA</i> <sup>C352T</sup> pJB91: P <sub>ompA</sub> - <i>davBAT</i>	2,60

### 20 Ejemplo 10: Biosíntesis del copolímero P(3HB-co-5HV) a partir de glucosa

El siguiente experimento era demostrar la producción del copolímero P(3HB-co-5HV) a partir de glucosa en una cepa de *E. coli* capaz de sintetizar los monómeros 3HB-CoA y 5HV-CoA e incorporarlos en PHA.

### Resultados experimentales

- 25 Los genes *btkB-phaB-kan* de la cepa MBX2114 se transdujeron a P1 en MBX3342 generando la cepa MBX3344. MBX3344 se transformó con los plásmidos pJB91 y pJG22 para crear la cepa MBX3344 [pJB91, pJG22]. Los plásmidos pSE380 y pACYC184, los vectores vacíos utilizados para construir pJG22 y pJB91, respectivamente, también se transformaron en MBX3344 para crear una cepa de control negativo, MBX3344 [pSE380, pACYC184]. Estas cepas se incubaron durante 48 h agitando a 300 rpm a 30 °C en medio E2 2x y se analizaron como se describe en los ejemplos anteriores. El medio consistía en glucosa 15 g/l, NaNH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub> 52 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 66 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 54 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, IPTG 0,1 mM y elementos traza como se describe anteriormente. Para los medios de cultivo de MBX3344 [pJB91, pJG22], se complementó cloranfenicol 25 µg/ml y gentamicina 5 µg/ml, mientras que a MBX3344 [pSE380, pACYC184] se añadieron cloranfenicol 25 µg/ml y ampicilina 100 µg/ml. El caldo de cultivo se complementó con glucosa 10 g/l después de 24 horas de incubación. La Tabla 11 muestra que el 5HV pudo incorporarse en la cepa que contenía todos los genes de la ruta metabólica de P(3HB-co-5HV) a partir de glucosa como la única fuente de carbono.

Tabla 11. Producción de P(3HB-co-5HV) a partir de glucosa

Cepa [Plásmido]	Genotipo del plásmido relevante	PHA Total (% dcw)	Incorporación de 3HB (% PHA)	Incorporación de 5HV (% PHA)
MBX3344 [pSE380, pACYC184]	pSE380: control de vector vacío pACYC184: control de vector vacío	0	100	0
MBX3344 [pJG22, pJB91]	pJG22: $P_{Trc}$ - <i>phaC</i> - <i>gsaR<sub>Ar</sub></i> - <i>orfZ</i> $P_{synI}$ - <i>dapA</i> <sup>C352T</sup> pJB91: $P_{ompA}$ - <i>davBAT</i>	42	92	8,0

A continuación, la cepa MBX3824 (W3110  $\Delta$ *gabD*::FRT  $\Delta$ *ynel*::FRT  $\Delta$ *cadA*::FRT  $\Delta$ *ldcC*::FRT  $\Delta$ *argO*::FRT *bktB-phaB-kan*) se ensayó como la cepa hospedadora para la producción del copolímero P(3HB-co-5HV) a partir de glucosa. En esta cepa, las rutas competidoras que podían separar L-lisina del comonomero 5HV-Coa se eliminaron del genoma de *E. coli*.

La primera ruta competidora puede convertir L-lisina en cadaverina y consiste en dos enzimas de L-lisina descarboxilasa (número EC 4.1.1.18) codificadas por *cadA* (Meng y Bennett, J. Bacteriol. 174(8): 2659-2669 (1992); EcoCyc número de registro: EG10131) e *ldcC* (véase Tabla 1A; Yamamoto y col., Genes Genet. Syst. 72(3): 167-72 (1997); EcoCyc número de registro: G6094).

Una segunda ruta competidora puede exportar L-lisina fuera de la célula microbiana. En *Corynebacterium glutamicum*, la proteína exportadora de L-lisina se ha identificado como LysE (véase la Tabla 1A; Vrljic y col., Mol. Microbiol. 22 (5): 815-826 (1996)). Para identificar supuestos genes exportadores de L-lisina en *E. coli*, se realizaron diversas búsquedas en bibliografías y patentes, así como búsquedas BLAST y Psi-BLAST, utilizando LysE de *C. glutamicum* como consulta. Se descubrieron seis proteínas que eran dianas para eliminar del genoma de *E. coli* para prevenir la exportación de L-lisina fuera de la célula. Estas incluían: (1) ArgO (también conocida como YggA, Nandineni y Gowrishankar, J. Bacteriol. 186: 3539-3546 (2004)), (2) YfiK (también conocida como EamB; Franke y col., J. Bacteriol. 185: 1161-1166 (2003)), (3) RhtB (anteriormente denominada YigK; Zakataeva y col., FEBS Lett. 452(3): 228-32 (1999)), (4) YahN (Kutukova y col., Mol Biol. (Mosk.) 39(3): 374-378 (2005)), (5) RhtC (anteriormente denominada YigJ; Zakataeva y col., FEBS Lett. 452(3): 228-32 (1999)) y (6) YeaS (también conocida como LeuE; Kutukova y col., FEBS Lett. 579(21): 4629-34 (2005)). ArgO parecía ser el candidato más probable para exportar L-lisina fuera de las células de *E. coli* basándose en su valor e más bajo de  $2e-22$  en búsquedas de tipo BLASTP utilizando LysE de *C. glutamicum* como consulta, en el grupo más cercano a LysE en un árbol filogenético después de ClustalX (Thompson y col., Nucleic Acids Res. 25: 4876-4882 (1997)) con LysE de *C. glutamicum* y en los seis homólogos de *E. coli*, y en la resistencia 3 veces aumentada comunicada para L-lisina así como una mayor acumulación de L-lisina del 38 % cuando *argO* se sobreexpresaba en comparación con las cepas de control solo con el vector (Livshits y col., Patente de Estados Unidos N.º 6.979.560). Sin embargo, las otras proteínas identificadas pueden exportar L-lisina también y por lo tanto también son dianas para la eliminación génica.

Otra ruta competidora puede convertir L-lisina en (R)- $\beta$ -lisina que está catalizada por lisina 2,3-aminomutasa (número EC 5.4.3.) codificada por *yjeK* de *E. coli* (número de registro EcoCyc: G7836; Behshad y col., Biochemistry 45(42): 12639-46 (2006)).

Se construyeron mutantes nulos *cadA* e *ldcC* individuales mediante el procedimiento de Recombinación genética Red/ET de Gene Bridges como se ha descrito anteriormente, utilizando los siguientes cebadores: DE118 (5'-TGTTCCATGTGTTGGGAGGGGCCTTTTTTACCTGGAGATATGACTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC) (SEQ ID NO: 38) y DE119 (5'-GAGCAAAAAGGGAAGTGGCAAGCCACTTCCCTTGTACGAGCTAAATGGGAATTAGCCATGGTCC) (SEQ ID NO: 39) para una mutación  $\Delta$ *cadA*::FRT-*kan*-FRT y DE122 (5'-GTTTGAGCAGGCTATGATTAAGGAAGGATTTTCCAGGAGGAACACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC) (SEQ ID NO: 40) y DE123 (5'-TATTTGTTAACAGCACGTTACTCGCCCGGAAGCCGCTCTGGCAAGATGGGAATTAGCCATGGTCC) (SEQ ID NO: 41) para la mutación  $\Delta$ *ldcC*::FRT-*cat*-FRT. Se construyó una mutación *argO* nula individual por el procedimiento de Recombinación genética Red/ET utilizando los cebadores DE106 (5'-GTGTTTTCTTATTACTTTCAAGGTCTTGCCTTGGGCGGCTATGTTGTAGGCTGGAGCTGCTTC) (SEQ ID NO: 42) y DE107 (5'-CTAACTGAACAAGGCTTGTGCATGAGCAATACCGTCTCTCGCCAG ATGGGAATTAGCCATGGTCC) (SEQ ID NO: 43). La cepa W3110  $\Delta$ *gabD*::FRT  $\Delta$ *ynel*::FRT  $\Delta$ *cadA*::FRT  $\Delta$ *ldcC*::FRT  $\Delta$ *argO*::FRT se construyó por transducciones repetitivas mediadas por P1 de los casetes  $\Delta$ *gabD*::FRT-

*kan-FRT*,  $\Delta yneI::FRT-kan-FRT$ ,  $\Delta cadA::FRT-kan-FRT$ ,  $\Delta ldcC::FRT-cat-FRT$ ,  $\Delta cadA::FRT-kan-FRT$  en la cepa W3110 (Bachmann, Bacteriol, Rev., 36 (4): 525-557 (1972)), que fue seguido de la eliminación de los marcadores *kan* o *cat* después de cada transducción mediada por P1 como se describe en los ejemplos anteriores. La cepa resultante MBX3818 se transdujo a P1 con la cepa donante MBX2114 para finalizar la construcción de MBX3824. Los plásmidos pJG22 y pJB91 se transformaron en MBX3824 y la cepa resultante MBX3824 [pJG22, pJB91] se ensayó con respecto a la producción de copolímero P(3HB-co-5HV) junto con MBX3344 [pJG22, pJB91]. Estas cepas se incubaron durante 48 h con agitación a 300 rpm a 30 °C en medio E2 1,5x y se analizaron como se describe en los ejemplos anteriores. El medio consistía en glucosa 15 g/l,  $NaNH_4HPO_4$  39 mM,  $K_2HPO_4$  49,5 mM,  $KH_2PO_4$  40,5 mM,  $MgSO_4$  2 mM, IPTG 0,1 mM y elementos traza como se describe anteriormente. Los medios de cultivo se complementaron con cloranfenicol 25 µg/ml y gentamicina 5 µg/ml. La Tabla 12 muestra que diversas cepas con diferentes fondos genéticos tienen la capacidad de producir P(3HB-co-5HV) a partir de glucosa con diferentes composiciones de 5HV en el polímero. En particular, la eliminación de rutas competidoras que separan el carbono de 5HV-CoA, tal como eliminando la proteína exportadora de L-lisina, *argO*, o los dos genes de lisina descarboxilasa, *cadA* e *ldcC*, aumenta la incorporación de 5HV en PHA.

**Tabla 12.** Producción de P(3HB-co-5HV) a partir de glucosa

Cepa [Plásmido]	Genotipo relevante	PHA Total (% dcw)	Incorporación de 3HB (% PHA)	Incorporación de 5HV (% PHA)
MBX3344 [pJG22, pJB91]	<p>MBX3344: MG1655 <math>\Delta gabD::FRT</math>  <math>\Delta yneI::FRT</math> <i>bktB-phaB-kan</i></p> <p>pJG22: <math>P_{Trc-phaC-gsaR_{AT-orfZ}}</math> <math>P_{synI}</math>-  <math>dapA^{C352T}</math></p> <p>pJB91: <i>PompA-davBAT</i></p>	47	89	11
MBX3824 [pJG22, pJB91]	<p>MBX3824: W3110 <math>\Delta gabD::FRT</math>  <math>\Delta yneI::FRT</math> <math>\Delta cadA::FRT</math> <math>\Delta ldcC::FRT</math>  <math>\Delta argO::FRT</math> <i>bktB-phaB-kan</i></p> <p>pJG22: <math>P_{Trc-phaC-gsaR_{AT-orfZ}}</math> <math>P_{synI}</math>-  <math>dapA^{C352T}</math></p> <p>pJB91: <i>PompA-davBAT</i></p>	33	81	19

**Ejemplo 11: Biosíntesis de copolímero P(4HB-co-5HV) a partir de 4-hidroxiacetato de sodio y de 5-hidroxiacetato de sodio**

El siguiente experimento consistía en demostrar la producción de copolímero P(4HB-co-5HV) en una cepa de *E. coli* capaz de sintetizar los monómeros 4HB-CoA y 5HV-CoA e incorporarlos en PHA. Los procedimientos para modificar por ingeniería genética los comonómeros 4HB en organismos recombinantes se han descrito con detalle en la Patente de Estados Unidos N.º 6,117,658, Patente de Estados Unidos N.º 6.316.262, Patente de Estados Unidos N.º 6.689.589, Patente de Estados Unidos N.º 7.081.357, Patente de Estados Unidos N.º 7.229.804, Patente de Estados Unidos N.º 6.759.219, y en la publicación de solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2004/0253693. En un experimento similar al descrito en el Ejemplo 1, se suministró 5-hidroxiacetato de sodio (Na5HV) a la cepa MG1655 [pMS93] junto con 4-hidroxiacetato de sodio (Na4HB). La cepa MG1655 [pMS93] contiene los genes *orfZ* y *phaC*, ambos de los cuales se requieren para generar 4HB-CoA y 5HV-CoA a partir de Na4HB y Na5HV, respectivamente, así como para polimerizar los precursores con el copolímero P(4HB-co-5HV). Na4HB, para su uso como sustrato, se preparó de manera similar al procedimiento descrito para la preparación de Na5HV en el Ejemplo 1 utilizando  $\gamma$ -butirolactona (GBL) en lugar de DVL. Las condiciones de cultivo utilizadas para la producción de copolímero también eran las mismas que las descritas en el Ejemplo 1 con la diferencia de que se añadieron 4 g/l de Na4HB al medio de producción. Después del periodo de producción de PHA, el análisis del contenido polimérico del cultivo de MG1655 [pMS93] prosiguió como se describe en el Ejemplo 1 excepto que se realizó una curva patrón para determinar el contenido de 4HB utilizando patrones GBL además de la curva patrón realizada para determinar el contenido de 5HV. Este análisis mostró que el cultivo de MG1655 [pMS93] al que se suministró conjuntamente Na4HB y Na5HV generó copolímero P(4HB-co-5HV) que comprendía un dcw de 67 % y tenía una composición que era 67 % de 4HB y 33 % de 5HV. Se analizó una muestra extraída de este polímero usando DSC y después se determinó que tenía una Tg de -54,9 °C y una Tm no detectable.

**Ejemplo 12: Biosíntesis de glutarato a partir de glucosa**

Para diferenciar cuáles de los dos productos génicos eran la GSA deshidrogenasa primaria, identificada en el Ejemplo 7, se compararon las cepas MG1655 [pJB91] de tipo silvestre, MG1655 $\Delta yneI::FRT$  [pJB91] y

MG1655 $\Delta$ *gabD*::FRT [pJB91] con respecto a su capacidad para la producción de glutarato a partir de 5-aminopentanoato, un metabolito intermedio entre la L-lisina y GSA (véase la Figura 2). Estas tres cepas contienen el plásmido pJB91 que expresa *davBAT* a partir del promotor  $P_{ompA}$  como se describe en el Ejemplo 5. Las tres cepas se cultivaron en medio mínimo E0 que contenía 5-aminopentanoato 2 g/l como se describe anteriormente y el glutarato se midió mediante un procedimiento de GC-MS a partir de los sobrenadantes del cultivo. El procedimiento y las condiciones de incubación eran los mismos que los descritos en el Ejemplo 7.

A diferencia de las otras dos cepas, MG1655 $\Delta$ *gabD* [pJB91] no acumulaba ningún glutarato detectable. Por tanto, la deshidrogenasa codificada por *gabD* tenía la mayor actividad hacia GSA. Por lo tanto, si se producían altas cantidades de glutarato, los hospedadores de producción necesitaban expresar *gabD* u sus homólogos (véase la Tabla 1P). Sin embargo, dado que MG1655 $\Delta$ *yneI* [pJB91] acumulaba cantidades ligeramente inferiores de glutarato a partir de 5-aminopentanoato en comparación con MG1655 [pJB91], 0,75 g/l frente a 1,0 g/l de glutarato, respectivamente, la deshidrogenasa codificada por *yneI* también tenía actividad moderada hacia GSA. Por tanto, la sobreexpresión de *yneI* o de sus homólogos (véase la Tabla 1Q), también podía producir altas cantidades de glutarato a partir de GSA, L-lisina o glucosa.

Los dos mejores homólogos de *GabD* presentes en *Corynebacterium glutamicum*, incluyen (1) la aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD (N.º de registro NP\_599302) y (2) la proteína hipotética cgR\_0068 (N.º de registro YP\_001136931). Inesperadamente, estas dos proteínas de *C. glutamicum* también se identificaron como los dos homólogos más cercanos a *YneI* de *E. coli*.

A continuación, se produjo glutarato a partir de glucosa. Para proporcionar una cepa sobreproductora de L-lisina, se construyó el plásmido pDE033 que contenía el gen *dapA*<sup>C352T</sup> resistente a retroalimentación por L-lisina de la siguiente manera: el producto de SOE-PCR para la fabricación del gen *dapA*<sup>C352T</sup>, descrito en el Ejemplo 9, se digirió con EcoRI y SacI, seguido de ligamiento con pSE380 que se había digerido con las mismas enzimas, creando de este modo el plásmido pDE033. El gen *dapA*<sup>C352T</sup> en pDE033 estaba bajo el promotor  $P_{trc}$  inducible por IPTG. Los plásmidos pDE033 y pJB91 (descritos anteriormente) se transformaron en la cepa MG1655 para crear la cepa MG1655 [pDE033, pJB91]. Las cepas MG1655 y MG1655 [pDE033, pJB91] se incubaron durante 48 h con agitación a 300 rpm a 30 °C en un medio que contenía glucosa 25 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 16 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/l, MgSO<sub>4</sub> 1 g/l, extracto de levadura 2 g/l, CaCO<sub>3</sub> 30 g/l, IPTG 0,1 mM y elementos traza como se describe anteriormente. El medio de cultivo para MG1655 [pDE033, pJB91] se complementó con ampicilina 100 µg/l y cloranfenicol 25 µg/ml. El glutarato se midió como se describe en el Ejemplo 7. Los datos mostrados en la Tabla 13 demuestran que MG1655 [pDE033, pJB91] secretó glutarato 0,7 g/l en el medio mientras que la cepa de control negativa MG1655 no produjo ningún glutarato. Este resultado demuestra claramente que la utilización de un gen *dapA* resistente a retroalimentación para acumular L-lisina, junto con el operón *davBAT* para convertir la L-lisina en GSA en una célula hospedadora que codifica una GSA deshidrogenasa, es suficiente para la producción de glutarato a partir de glucosa como la única fuente de carbono.

**Tabla 13.** Producción de glutarato a partir de glucosa

Cepa [Plásmido]	Genotipo del plásmido relevante	Glutarato (g/l)
MG1655		0
MG1655 [pDE033, pJB91]	pDE33: $P_{Trc}$ - <i>dapA</i> <sup>C352T</sup> pJB91: $P_{ompA}$ - <i>davBAT</i>	0,7

### Ejemplo 13: Biosíntesis de 1,5-pentanodiol a partir 5-hidroxivalerato de sodio

#### Construcción de cepas

La cepa MBX3017 (LS5218  $\Delta$ *adhE*::FRT,  $\Delta$ *ldhA*::FRT,  $\Delta$ *ackA-pta*::FRT) y la cepa MG1655 de K-12 se utilizaron como una cepa hospedadora para evaluar si el 1,5-pentanodiol (PDO) podía acumularse y secretarse en el medio. Cada cepa de eliminación individual se construyó por el procedimiento Red/ET de Gene Bridges. En la Tabla 14 se enumeran cebadores para la construir casetes desactivados para las tres rutas. En resumen, para la construcción de las diversas eliminaciones cromosómicas se utilizaron los siguientes cebadores: MS286 y MS287 para el casete *AdhE*; MS289 y MS290 para el casete *ackA-pta*; y MS292 y MS293 para el casete *ldhA*. La LS5218  $\Delta$ *adhE*::FRT,  $\Delta$ *ldhA*::FRT,  $\Delta$ *ackA-pta*::FRT se obtuvo por transducción a P1 repetitiva de cada mutación nula individual en LS5218 y eliminando el marcador como se describe en el ejemplo anterior.

Tabla 14: Cebadores utilizados para estudios de PDO

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Comentario
MS286	CCGTTTATGTTGCCAGACAGCGCTACTGATTAAGCGGATTTT TTCGCTTTCATATGAATATCCTCCTTAGT (SEQ ID NO:44)	casete $\Delta adhE$
MS287	CGAGCAGATGATTTACTAAAAAAGTTTAAACATTATCAGGAG AGCATTATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO:45)	casete $\Delta adhE$
MS289	TGGCTCCCTGACGTTTTTTAGCCACGTATCAATTATAGGTA CTTCCATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO:46)	casete $\Delta ackA pta$
MS290	GCAGCGCAAAGCTGCGGATGATGACGAGATTACTGCTGCTG TGCAGACTGCATATGAATATCCTCCTTAGT (SEQ ID NO:47)	casete $\Delta ackA pta$
MS292	CTCCCCTGGAATGCAGGGGAGCGGCAAGATTAAACCAGTTC GTTCGGGCACATATGAATATCCTCCTTAGT (SEQ ID NO:48)	casete $\Delta pha$
MS293	TATTTTTAGTAGCTTAAATGTGATTCAACATCACTGGAGAA AGTCTTATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO:49)	casete $\Delta pha$
FS011	TCCCCTAGGATTCAGGAGGTTTTTATGGAGTGGGAAGAGAT ATATAAAG (SEQ ID NO:50)	5' de <i>orfZ</i>
FS008	CCTTAAGTCGACAAATTCTAAAATCTTTTTAAATTC (SEQ ID NO: 51)	3' de <i>orfZ</i>
JRG047	TTCAGGATCCTGCGCATGCTAGCTATAGTTCTAGAGGTA (SEQ ID NO:52)	5' de <i>pduP</i>
JRG048	CATACGATAGCTCATAAAAAACCTCCTCGCAGTTAGCGAATA GAAAAGCCGTTGG (SEQ ID NO:53)	3' de <i>pduP</i>
JRG049	GAGGAGGTTTTTATGAGCTATCGTATGAGCTATCGTATGTTT GATTATCTGGTGC (SEQ ID NO:54)	5' de <i>dhaT</i>
JRG050	TCTTTCATGAACTCAGAATGCCTGGCGGAAAATCG (SEQ ID NO: 55)	3' de <i>dhaT</i>

El gen *pduP* que codifica la propionaldehído deshidrogenasa dependiente de CoA de *S. typhimurium* (véase la Tabla 1A; Leal, Arch. Microbiol. 180: 353-361 (2003)) se amplificó con los cebadores JRG47 y JRG48. El gen *dhaT* que codifica la 1,3-propanodiol deshidrogenasa de *Klebsiella pneumoniae* (véase la Tabla 1A; Tong y col., Appl. Environ. Microbiol. 57(12): 3541-3546 (1991)) se amplificó con los cebadores JRG49 y JRG50. Los dos genes se fusionaron entre sí mediante SOE-PCR utilizando los cebadores JRG47 y JRG50. El fragmento de ADN resultante se clonó en pJB87 mediante los sitios BamHI y BspHI y el plásmido resultante se denominó pJG10.

La cepa MBX3017 o MG1655 que llevaban pFS16 o pSE380 y pJG10 o pJB78 se fusionaron para estudios de PDO.

- 5 Las cepas se cultivaron durante 40 h en condiciones limitadas de oxígeno en medio E2 que contenía 5HV. El medio consistía en: glucosa 10 g/l, 5HV 2 g/l,  $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$  26 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  33 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  27 mM,  $\text{MgSO}_4$  2 mM, cloranfenicol 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , IPTG 0,1 mM y elementos traza, como se describe anteriormente. Los cultivos de una noche se inocularon en un tubo de cultivo sellado que contenía medio reciente a una  $\text{DO}_{600}$  final de aproximadamente 0,2, el espacio de cabeza del tubo de cultivo era pequeño para garantizar la limitación de oxígeno del cultivo. Los cultivos se incubaron a 30 °C. Después de 48 h de incubación, se extrajeron 100  $\mu\text{l}$  de muestra, se centrifugó y el sobrenadante resultante se añadió con 1,4-butanodiol (0,1 g/l) como patrón interno, se secó en un centrivap de Labconco y se resuspendió en acetonitrilo (ACN) 100  $\mu\text{l}$  por ultrasonido durante 3 h. La solución de acetonitrilo se centrifugó para extraer el material insoluble y el sobrenadante se inyectó en un GC-MC Agilent 5875 equipado con una columna DB-225ms utilizando los siguientes parámetros de adquisición: caudal de gas helio
- 10
- 15

transportador 1 ml/min, modo barrido m/z 30-500, programa del horno: 40 °C durante 2 min, después aumento a 220 °C a 10 °C/min, temperatura de la fuente de iones 230 °C y temperatura del filtro de masa de cuadrupolo a 150 °C.

En la Tabla 14 se muestran los resultados de la medición de PDO (1,5-pentanodiol). La combinación de la cepa hospedadora MBX3017 y la sobreexpresión de *orf Z-dhaT-pduP*, produjo un rendimiento de PDO más alto de 0,32 g/l. La cepa MG1655, que llevaba estos tres genes, produjo un rendimiento más bajo de 0,22 g/l, posiblemente debido a su ruta activa de etanol, acetato y lactato, que son aceptores de electrones conocidos (Clark, FEMS Microbiol. Rev. 5: 223-34 (1989)) y que pueden competir con la ruta 5HV para NAD(P)H. Cabe destacar que, MG1655 que tan solo lleva *orfZ* también produce pequeñas cantidades de PDO, mientras que la cepa hospedadora MBX3017 no produce ningún PDO detectable (Tabla 15). Esto indica que una alcohol deshidrogenasa endógena, por ejemplo *adhE*, tiene una débil actividad hacia 5HV-CoA. El PDO medido se confirmó por GC-MS frente al patrón de PDO y un espectro de referencia de PDO de la biblioteca del NIST, como se muestra en la Figura 8. Estos resultados demuestran que, a partir de Na5HV puede producirse PDO, cuando el gen *orfZ* se expresa para generar 5HV-CoA y QUE los genes *pduP-dhaT* se expresan convirtiendo 5HV-CoA en 5-hidroxipentalal y en PDO.

**Tabla 15:** Título de PDO de cepas cultivadas en medio que contiene 5HV<sup>a</sup>

Plásmidos y genes expresados	PDO (g/l)	
	MG1655	MBX3017
pFS16: P <sub>trc</sub> - <i>orfZ</i> pJB78: vector vacío	0,08	0
pJG10: P <sub>tet</sub> - <i>pduP-dhaT</i> pSE380: vector vacío	0	0
pFS16: P <sub>trc</sub> - <i>orfZ</i> pJG10: P <sub>tet</sub> - <i>pduP-dhaT</i>	0,22	0,32
pJB78: vector vacío pSE380: vector vacío	0	0

<sup>a</sup> Los resultados son el promedio de tres experimentos repetidos independientes.

15

Secuencia de nucleótidos, Gene ID 001: Gen *gsaR<sub>A12</sub>* de glutarato semialdehído reductasa de *Aspergillus terreus* NIH2624

ATGCCACTGGTTGCTCAAAATCCACTGCCACGTGCTATTTCTGGGTCTGATG  
 ACTTTCGGTCCGAGCGAAAGCAAAGGTGCGCGTATCACTTCCCTGGATGAG  
 TTTAACAAAGTGCCTGGATTACTTCCAGCAGCAGGGCTTCCAGGAAATCGAT  
 ACCGCGCGCATCTACGTCGGCGGTGAACAGGAGGCATTCACGGCGCAGGCA  
 AAGTGGAAAGAACGCGGCCTGACGCTGGCGACTAAGTGGTATCCGCAGTAC  
 CCGGGTGCGCACAAACCGGATGTCCTGCGTCAGAACCTGGAGCTGTCCCTG  
 AAAGAACTGGGCACGAACCAGGTCGATATCTTCTATCTGCACGCCGCGGAT  
 CGTTCCTGTGCCGTTTCGCGGAAACTCTGGAAACTGTTAACGAACCTGCACAAA  
 GAAGGCAAATTTGTTTACGCTGGGTCTGTCTAACTACACCGCTTTCGAAGTA  
 GCTGAAATCGTGACCCTGTGTAACGAGCGTGGTTGGGTTTCGTCCGACTATC  
 TACCAGGCGATGTATAACGCTATCACCCGTAACATCGAAACTGAACTGATC  
 CCGGCGTGCAAGCGTTACGGTATTGACATTGTTATCTACAACCCACTGGCG  
 GGTGGCCTGTTTCAGCGGCAAATACAAAGCACAGGACATCCCAGGCTGAAGGT  
 CGTTACAGCGACCAATCTTCCATGGGCCAGATGTACCGCAACCGTTACTTT  
 AAGGACGCAACCTTTGACGCTCTGCGCCTGATCGAACCGGTTGTTGCGAAG  
 CACGGCCTGACGATGCCGAAACCGCGTTCCGCTGGGTCCACCACCACTCC  
 GCACTGAACATGGAAGATGGCGGCCGTGACGGCATCATCTGGGTGTAAGC  
 AGCCTGGCTCAGCTGGAACAACCTGAAAGACATTCAGAAAGGTCCGCTG  
 CCGCAGGAGGTTGTAGACGTCTTGGATCAGGCTTGGCTGGTGGCTAAGCCG  
 ACGGCTCCAACTACTGGCATCTGGACCTGAAATACACGTACGACACCCAG  
 GAAGCTCTGTTCAAACCGAAATCTAAGGCGTAA (SEQ ID NO:56)

Secuencia de aminoácidos, Gene ID 001: Gen gsaR<sub>A12</sub> de glutarato semialdehído reductasa de *Aspergillus terreus* NIH2624

MPLVAQNPLPRAILLGLMTFGPSESKGARITSLDEFNKCLDYFQQQGFQEID  
 TARIYVGGEQEAFTAQAKWKERGLTLATKWYPQYPGAHKPDVLRONLELSL  
 KELGTNOVDIFYLHAADRSVPFAETLETVNELHKEGKQVQLGLSNYTAFEV  
 AEIVTLCNERGWVRPTIYQAMYNATRNIELELIPACKRYGIDIVIYNPLA  
 GGLFSGKYKAQDIPAEGRYSQSSMGQMYRNRYPFKDATFDALRLIEPVVAK  
 HGLTMPETAFRWWHHHSALNMEDGGRDGIILGVSSLAQLENNLKDIOKGPL  
 PQEVVDVLDQAWLVAKPTAPNYWHLDLKYTYDTQEALFKPKSKA (SEQ  
 ID NO:57)

5 Secuencia de nucleótidos, Gene ID 002: Gen gsaR<sub>A1</sub> de glutarato semialdehído reductasa de *Arabidopsis thaliana*

ATGGAAGTAGGTTTTCTGGGTCTGGGCATTATGGGTAAAGCTATGTCCATG  
 AACCTGCTGAAAAACGGTTTTCAAAGTTACCGTGTGGAACCGCACTCTGTCT  
 AAATGTGATGAACTGGTTGAACACGGTGCAAGCGTGTGCGAGTCTCCGGCT  
 GAGGTGATCAAGAAATGCAAATACACGATCGCGATGCTGAGCGATCCGTGT  
 GCAGCTCTGTCTGTTGTTTTTCGATAAAGGCGGTGTTCTGGAACAGATCTGC  
 GAGGGTAAGGGCTACATCGACATGTCTACCGTCGACGCGGAAACTAGCCTG  
 AAAATTAACGAAGCGATCACGGGCAAAGGTGGCCGTTTTGTAGAAGGTCCT  
 GTTAGCGGTTCCAAAAGCCGGCAGAAGACGGCCAGCTGATCATCCTGGCA  
 GCAGGCGACAAAGCACTGTTTCGAGGAATCCATCCCAGCCTTTGATGTACTG  
 GGCAAACGTTCCTTTTATCTGGGTGAGGTGGGTAAACGGTGCGAAAATGAAA  
 CTGATTGTTAACATGATCATGGGTTCTATGATGAACGCGTTTTAGCGAAGGT

CTGGTACTGGCAGATAAAAGCGGTCTGTCTAGCGACACGCTGCTGGATATT  
CTGGATCTGGGTGCTATGACGAATCCGATGTTCAAAGGCAAAGGTCCGTCC  
ATGACTAAATCCAGCTACCCACCGGCTTTCCCGCTGAAACACCAGCAGAAA  
GACATGCGTCTGGCTCTGGCTCTGGGCGACGAAAACGCTGTTAGCATGCCG  
GTCGCTGCCGCTGCGAACGAAGCCTTCAAGAAAGCCCGTAGCCTGGGCCTG  
GGCGATCTGGACTTTTCTGCTGTTATCGAAGCGGTAAAATTCTCTCGTGAA  
TAA (SEQ ID NO:58)

Secuencia de aminoácidos, Gene ID 002: Gen gsaR<sub>At</sub> de glutarato semialdehído reductasa de *Arabidopsis thaliana*

MEVGFLLGLGIMGKAMSMNLLKNGFKVTVWNRTLSKCDELVEHGASVCESPA  
EVIKKCKYTIAMLSDPCAALSVVFDKGGVLEQICEGKGYIDMSTVDAETSL  
KINEAITGKGGRFVEGPPVSGSKKPAEDGQLIILAAGDKALFEESIPAFDVL  
GKR SFYLGQVGN GAKMKLIVNMIMGSMNNAFSEGLVLADKSGLS SDTLLDI  
LDLGAMTNPMFKGKGPSMTKSSYP PAFPLKHQQKDMRLALALGDENAVSMP  
VAAAANEAFKKARSLGLGDLDFSAVIEAVKFSRE (SEQ ID NO:59)

5 Secuencia de nucleótidos, Gene ID 003: Genes de fusión phaC3/C5 de polihidroxicanoato sintasa de *Pseudomonas putida*/*Zoogloea ramigera*

ATGAGTAACAAGAACAACGATGAGCTGCAGTGGCAATCCTGGTTCAGCAAG  
 GCGCCACCACCGAGGCGAACCCGATGGCCACCATGTTGCAGGATATCGGC  
 GTTGCCTCAAACCGGAAGCGATGGAGCAGCTGAAAAACGATTATCTGCGT  
 GACTTCACCGCGTTGTGGCAGGATTTTTTGGCTGGCAAGGCGCCAGCCGTC  
 AGCGACCGCCGCTTCAGCTCGGCAGCCTGGCAGGGCAATCCGATGTCGGCC  
 TTCAATGCCGCATCTTACCTGCTCAACGCCAAATTCCTCAGTGCCATGGTG  
 GAGGCGGTGGACACCGCACCCAGCAAAAGCAGAAAATACGCTTTGCCGTG  
 CAGCAGGTGATTGATGCCATGTCGCCCGCGAACTTCCTCGCCACCAACCCG  
 GAAGCGCAGCAAAAAGTATTGAAACCAAGGGCGAGAGCCTGACGCGTGGC  
 CTGGTCAATATGCTGGGCGATATCAACAAGGGCCATATCTCGCTGTCCGAC  
 GAATCGGCCTTTGAAGTGGGCCGCAACCTGGCCATTACCCCGGGCACCGTG  
 ATTTACGAAAATCCGCTGTTCCAGCTGATCCAGTACACGCCGACCACGCCG  
 ACGGTGAGCCAGCGCCCGCTGTTGATGGTGCCCGCCGTGCATCAACAAGTTC  
 TACATCCTCGACCTGCAACCGGAAAATTCGCTGGTGCCTACGCGGTGGAG  
 CAGGGCAACACCGTGTTCCCTGATCTCGTGGAGCAATCCGGACAAGTCGCTG  
 GCCGGCACCACTGGGACGACTACGTGGAGCAGGGCGTGATCGAAGCGATC  
 CGCATCGTCCAGGACGTCAGCGGCCAGGACAAGCTGAACATGTTCCGCTTC  
 TGCGTGGGCGGCACCATCGTTGCCACCGCACTGGCGGTACTGGCGGCGCGT  
 GGCCAGCACCCGGCGGCCAGCCTGACCCTGCTGACCACCTTCCTCGACTTC  
 AGCGACACCGGCGTGCTCGACGTCTTCGTGATGAAACCCAGGTGCGCGCTG  
 CGTGAACAGCAATTGCGCGATGGCGGCCTGATGCCGGGCGGTGACCTGGCC  
 TCGACCTTCCTGAGCCTGCGTCCGAACGACCTGGTATGGAACCTATGTGCAG  
 TCGAACTACCTCAAAGGCAATGAGCCGGCGGCGTTCGACCTGCTGTTCTGG  
 AATTCGGACAGCACCAATTTGCCGGGCCCCGATGTTCTGCTGGTACCTGCCG  
 AACACCTACCTGGAAAACAGCCTGAAAGTGCCGGGCAAGCTGACGGTGGCC  
 GGCGAAAAGATCGACCTCGGCCTGATCGACGCCCCCGCCTTCATCTACGGT  
 TCGCGCGAAGACCACATCGTGCCGTGGATGTCCGGCGTACGGTTCGCTCGAC  
 ATCCTCAACCAGGGCAAGCCGGGCGCCAACCGCTTCGTGCTGGGCGCGTCC  
 GGCCATATCGCCGGCGTGATCAACTCGGTGGCCAAGAACAAGCGCAGCTAC  
 TGGATCAACGACGGTGGCGCCCGGATGCCAGGCCTGGTTCGATGGCGCG

CAGGAAGTGCCGGGCGAGCTGGTGGCCGCAATGGGCGGGTTCCTGACCCAG  
 CATGGCGGCAAGAAGGTCAAGCCCAAGGCCAAGCCCGGCAACGCCCGCTAC  
 ACCGCGATCGAGGCGGCGCCCGGCGTTACGTCAAAGCCAAGGGCTGA  
 (SEQ ID NO: 60)

5 Secuencia de aminoácidos, Gene ID 003: Genes de fusión phaC3/C5 de polihidroxialcanoato sintasa de *Pseudomonas putida*/*Zoogloea ramigera*

MSNKNNDELQWQSWFSKAPTTEANPMATMLQDIGVALKPEAMEQLKNDYLR  
 DFTALWQDFLAGKAPAVSDRRFSSAAWQGNPMSAFNAASYLLNAKFLSAMV  
 EAVDTAPQKQKIRFAVQQVIDAMSPANFLATNPEAQOKLIETKGESLTRG  
 LVNMLGDINKGHISLSDESAFEVGRNLAITPGTVIYENPLFQLIQYTPPTP  
 TVSQRPLLMVPPCINKFYILDLQPENSLVRYAVEQGNVFLISWSNPKDSL  
 AGTTWDDYVEQGVIEAIRIVQDVSGQDKLNMFGFCVGGTIVATALAVLAAR  
 GQHPAASLTLLTFLDFSDTGVLDVFDVDETQVALREQQLRDGGGLMPGRDLA  
 STFSSLRPNDLVWNYVQSNYLKGNPAAFDLLFWNSDSTNLPGPMFCWYLR  
 NTYLENSLKVPGKLTVAGEKIDLGLIDAPAFIYGSREDHIVPWMSAYGSLD  
 ILNQGKPGANRFVLGASGHIAGVINSVAKNKRSYWINDGGAADAQAWFDGA  
 QEVPGSWWPQWAGFLTQHGGKVKPKAKPGNARYTAIEAAPGRYVKAKG  
 (SEQ ID NO:61)

Secuencia de nucleótidos, Gene ID 004: Subunidad phaE de polihidroxicanoato sintasa de *Thiocapsa phenigii*

ATGGCTGGTGACCACGTCGTGGAATGCCTTCGAA TTCAGGAGGTTTTTATG  
 AACGATACGGCCAACAAGACCAGCGACTGGCTGGACATCCAACGCAAGTAC  
 TGGGAGACCTGGTCGGAGCTCGGCCGCAAGACCTTGGGTCTGGAGAAGACC  
 CCGGCCAATCCTTGGGCCGGCGCCCTCGATCATTGGTGGCAGACGGTCTCG  
 CCCGCCGCCCCAACGACCTGGTTCGCGACTTCATGGAGAAGCTCGCCGAG  
 CAGGGCAAGGCCTTCTTCGGCCTCACCGACTACTTCACGAAGGGCCTCGGC  
 GGCAGTAGCGGTACGCAGGGCTGGGACACCCCTCTCGAAGACCATCGACGAC  
 ATGCAAAAGGCCTTCGCCAGCGGCCGATCGAAGGCGACGAGACCTTCCGC  
 CGCCTGATGGCCTTCTGGGAGATGCCGCTCGACA ACTGGCAGCGCACCATG  
 TCCTCGCTGTCCCCGGTGCCCGGCGACCTGCTGCGCAACATGCCGCACGAC  
 CAAGTCAGGGACAGCGTCGACCCGCATCCTCTCGGCACCCGGGCTCGGCTAC  
 ACGCGCGAGGAGCAGGCCCGCTACCAGGATCTGATCCGCCGCTCGCTGGAG  
 TACCAGTCGGCCCTGAACGAATAACAACGGCTTCTTCGGCCAGCTCGGTGTC  
 AAGTCCCTCGAGCGGATGCGCGCCTTCTGTCAGGGACAGGCCGAGAAGGGC  
 GTCGCCATCGAGTCGGCGCGCACCCCTCTACGACGCCTGGGTGGCTGCTGC  
 GAAGAGGTCTATGCCGAGGAGGTCAGCTCCGCCGACTACGCGCACATCCAC  
 GGCCGCTCGTCAACGCCCAGATGGCCCTCAAGCAGCGCATGTGACCATG  
 GTCGACGAGGTCTCGGCGCGATGCCGCTGCCGACCCGCGAGCGAGCTGCGC  
 ACGCTCCAGGATCGGCTCCAGGAGTCGCGCGGGCGAGGGCAAGCGCCAGCGC  
 CAAGAGATCGAGACGCTGAAGCGGCAGGTCGCGGCCTTGGCCGGCGGGCGCC  
 CAGCCCCGCGCCCCAGGCCTCCGCCAGCCCAGCACCCGGCCCCGCGCCGGCG  
 ACGGCCCCGGCGGGCGAGCGCGGCCCAAGCGCAGCACCCGACCCGCCCCG  
 AAGACCACCAAGCCCACCACCGGCCAGTGA (SEQ ID NO:62)

Secuencia de aminoácidos, Gene ID 004: Subunidad phaE de polihidroxicanoato sintasa de *Thiocapsa phenigii*

MNDTANKTSDWLDIQRKYWETWSELGRKTLGLEKTPANPWAGALDHWQTV  
 SPAAPNDLVRDFMEKLAEQGKAFFGLTDYFTKGLGGSSGTQGWDTLSKTI  
 DMQKAFASGRIEGDETFRRLMAFWEMPLDNWQRTMSSLSVPVGDLLRNMPH  
 DQVRDSVDRI LSAPGLGYTREEQARYQDLIRRSLEYQSALNEYNGFFGQLG  
 VKSLERMRAFLOQQAQEKGVAI ESARTLYDAWVGCCEEVYAEVSSADYAH  
 HGRLVNAQMALKQRMSTMVDEVLGAMPLPTRSELRTLQDRLOESRGEGRQ  
 RQEIETLKRQVAALAGGAQPAPQASAQPSTRPAPATAPAASAAPKRSTTTR  
 RKTTKPTTGQ (SEQ ID NO:63)

Secuencia de nucleótidos, Gene ID 005: Subunidad phaC de polihidroxicanoato sintasa de *Thiocapsa phenigii*

ATGTCCCATTCCTCGATCGACATCCGGCCCGACAAGCTGACCGAGGAGATG  
 CTGGAGTACAGCCGCAAGCTCGGCGAGGGTATGCAGAACCTGCTCAAGGCC  
 GACCAGATCGACACAGGCGTCACCCCAAGGACGTCGTCCACCGCGAGGAC  
 AAGCTGGTCTCTACCGCTACCGGCGCCCGGCGCAGGTGGCGACCCAGACG  
 ATCCCGCTGCTGATCGTCTACGCCCTCGTCAATCGGCCCTACATGACCGAC  
 ATCCAGGAGGATCGCTCGACGATCAAGGGCCTGCTCGCCACCGGTCAGGAC  
 GTCTATCTGATCGACTGGGGCTACCCGGATCAGGCCGACCGGGCGCTGACC  
 CTCGATGACTACATCAACGGCTACATCGACCGCTGCGTCTGACTACCTGCGC  
 GAGACCCACGGCGTTCGACCAGGTCAACCTGCTCGGGATCTGCCAGGGCGGG  
 GCCTTCAGCCTCTGCTACACGGCCCTGCACTCCGAGAAGGTCAAAAACCTC  
 GTCACCATGGTCAACGGTTCGACTTCCAGACCCCGGGCAACCTGCTCTCG  
 GCCTGGGTCCAGAACGTCGACGTCGACCTGGCCGTCGACACCATGGGCAAC  
 ATCCCGGGCGAACTGCTCAACTGGACCTTCTGTGCTCAAGCCCTTCAGC  
 CTGACCGGCCAGAAGTACGTCAACATGGTTCGACCTGCTCGACGACGAGGAC  
 AAGGTCAAGAACTTCTGCGGATGGAGAAGTGGATCTTCGACAGCCCGGAC  
 CAGGCCGGCGAGACCTTCCGCCAGTTCATCAAGGACTTCTACCAGCGCAAC  
 GGCTTCATCAACGGCGGCGTCTGATCGGCGATCAGGAGGTTCGACCTGCGC  
 AACATCCGCTGCCCGGTCTGAACATCTACCCGATGCAGGACCACCTGGTG  
 CCGCCGGATGCCTCCAAGGCCCTCGCGGGACTGACCTCCAGCGAGGACTAC  
 ACGGAGCTCGCCTTCCCGGCGGGCACATCGGCATCTACGTGAGCGGCAAG  
 GCGCAGGAAGGAGTCACCCCGGCGATCGGCCGCTGGCTGAACGAACGCGGC  
 TGA (SEQ ID NO:64)

Secuencia de aminoácidos, Gene ID 005: Subunidad phaC de polihidroxicanoato sintasa de *Thiocapsa phenigii*

MSPFPIDIRPDKLTEEMLEYSRKLGEQMQLLKADQIDTGVTPKDVVHRED  
 KLVLYRYRPAQVATQTIPLLIYALVNRPYMTDIQEDRSTIKGLLATGQD  
 VYLIDWGYPDQADRALTDDYINGYIDRCVDYLRETHGVDQVNLGICQGG  
 AFSLCYTALHSEKVKNLVMTVPVDFQTPGNLLSAWVQNVVDLAVDTMGN  
 IPGELLNWTFSLKPFSLTGQKYVNMVDLLDDEDKVKNFLRMEKWI'F'DSPD  
 QAGETFRQFIKDFYQRNGFINGVLIQDQEVDLRNIRCPVLNIYPMQDHLV  
 PPDASKALAGLTSSSEDYTELAFPGGHIGIYVSGKAQEGVTPAIGRWLNERG  
 (SEQ ID NO:65)

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FARMER, WILLIAM R

BICKMEIER, JEFF  
 LU, CHENFENG  
 CHANG, DONG-EUN  
 SKRALY, FRANK  
 RAMSEIER, TOM M

5

<120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS DE POLI(5HV) Y DE 5 ÁTOMOS DE CARBONO

10

<130> MBX 067

<150> US 61/122,250

<151> 12-12-2008

15

<160> 65

<170> Patentin Versión 3.3

20

<210> 1

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador sintético FS-E5'

<400> 1

ggaattcagg aggttttat gaacgatcgc gccacaaga ccagc

45

30

<210> 2

<211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador sintético FS-E3'

<400> 2

ggggtacctc actggccggt ggtgggcttg gtggtcttgc ggcg44

40

<210> 3

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Cebador sintético FS-C5'

<400> 3

ggggtaccag gaggtttta tgtcccatt cccgatcgac atccg

45

50

<210> 4

<211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Cebador sintético FS-C3'

<400> 4

cgggatcctc agccgcgttc gttcagccag cggccgatcg ccg

43

60

<210> 5

<211> 47

<212> ADN

65

ES 2 639 413 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético K5-1 5'  
 5  
 <400> 5  
 gctgaggatc caggaggttt ttatgttagg tcagatgatg cgtaac 47  
 <210> 6  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Cebador sintético K3-1  
 15  
 <400> 6  
 ctagaggatc ctattcaca gacagaagaa ctactg 36  
 <210> 7  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Cebador sintético K5-2  
 25  
 <400> 7  
 aattcaggag gttttatgt taggtcagat gatgcgtaac c 41  
 30  
 <210> 8  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Cebador sintético K3-2  
 40  
 <400> 8  
 gatccttatt cacagacaga agaactactg 30  
 <210> 9  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Cebador sintético Posynrbs.c  
 50  
 <400> 9  
 ggaattcagg aggttttat gtaggtcag atgatgcgta atcag 45  
 <210> 10  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Cebador sintético Posynrbs.r  
 60  
 <400> 10  
 cgggatcctt attcacagac agaagaacta ctgcg 35  
 <210> 11  
 <211> 43  
 <212> ADN

# ES 2 639 413 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético A.eut.PhaG.c  
 5  
 <400> 11  
 ggaattcggg tcccaagtac cttgccgaca tctatgcgct ggc 43  
 <210> 12  
 10 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador sintético A.eut.EcoRI.r  
 <400> 12  
 ggaattcccg gctccgggat tgccctggcc ggact 35  
 20 <210> 13  
 <211> 47  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador sintético MS069  
 <400> 13  
 30 ggtggatcct taagaggagg ttttatgac gcggaagtg gtagtgg 47  
 <210> 14  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador sintético MS070  
 <400> 14  
 40 ggtgctagct cagatagcgt cgaagatggc g 31  
 <210> 15  
 <211> 47  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético MS071  
 50 <400> 15  
 ggtcctaggt taagaggagg ttttatgac aacattaca ggtaaag 47  
 <210> 16  
 <211> 35  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético MS072  
 60 <400> 16  
 ggtgctggccg cttacatgta taagccgccc ttaat 35  
 <210> 17  
 65 <211> 31  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético JB123b  
 5  
 <400> 17  
 ttatttcattg aaccctcgaa ttgacgcgct c 31  
 <210> 18  
 10 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador sintético JB124a  
 <400> 18  
 ttatttcattg agcttatcga taccgtcgac c 31  
 20 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador sintético JB134  
 <400> 19  
 30 tgagcggata acaatttcac 20  
 <210> 20  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador sintético JB135  
 <400> 20  
 40 aataacacgt caacgcaaaa aggccatccg t 31  
 <210> 21  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético JB136  
 50 <400> 21  
 ttttcatat gaggagggtt ttatgaacaa gaagaaccgc ca 42  
 <210> 22  
 <211> 31  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético JB137  
 60 <400> 22  
 tttttgtac atcagcctt acgcagggtgc a 31  
 <210> 23  
 65 <211> 42  
 <212> ADN

ES 2 639 413 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético JB138  
 5  
 <400> 23  
 tatatactag taggaggata atatgagcaa aaccaacgaa tc 42  
 <210> 24  
 10 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador sintético JB139  
 <400> 24  
 ttttgtgca ctcaggcgat ttcagcgaag c 31  
 20 <210> 25  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Cebador sintético JB145  
 <400> 25  
 30 ttttagatc taggaggtt ttatgctgcg tgctgctct cg 42  
 <210> 26  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador sintético JB146  
 <400> 26  
 40 ttttagatc ttagcggaa atagttgga c 31  
 <210> 27  
 <211> 109  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético RF314  
 50 <400> 27  
 gcaagccaga gtaacccegg acgcacgctg cgagcggcac gtagtgtgga tgccttacac 60  
 gccgcattta atcaataacc ttgagcgatt gtgtaggctg gagctgctt 109  
 <210> 28  
 55 <211> 110  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60 <223> Cebador sintético RF315  
 <400> 28

ES 2 639 413 T3

	gaatttgccc aacgccacgg ggaatcgct gactgoggcg ctgcattaac tctttattgc	60
	tgttcattcg cattctccag atgggaatta gccatgggcc atatgaatat	110
5	<210> 29 <211> 73 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sintético MS220  <400> 29	
	gcaagagtaa atctgcgtat cttcatacca tgactcataa aggagatacc ccggtgtagg	60
	ctggagctgc ttc	73
15	<210> 30 <211> 71 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador sintético MS217  <400> 30	
	accgcaggtc tgaaaagacc tgcgagtata tcagagctga atatgtcgcg catatgaata	60
25	tcctccttag t	71
30	<210> 31 <211> 61 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador sintético MS223  <400> 31	
	tcgattcgtg aataagtggc ttaatattat tcattttaaa gcaagagtaa atctgcgtat	60
	c	61
40	<210> 32 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador sintético MS224  <400> 32 gccacttct actcctggac cgcaggctcg aaaagacctg cgagtatac agagctg	57
50	<210> 33 <211> 58 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

# ES 2 639 413 T3

```

<220>
<223> Cebador sintético DE081

<400> 33
5   aaaagaattc ttaattaatt ctagaaggag gtttcatatg ttcacgggaa gtattgtc   58

<210> 34
<211> 33
<212> ADN
10  <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético DE082

15  <400> 34
    agcgatggct ttgaaatact gatacaaacc ttc   33

<210> 35
<211> 33
20  <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético DE083

25  <400> 35
    gaaggtttgt atcagtattt caaagccatc gct   33

<210> 36
<211> 54
30  <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético DE084

35  <400> 36
    cccgagctcg tttaaactta attaagacta gttttacagc aaaccggcat gctt   54

<210> 37
<211> 63
40  <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

45  <220>
    <223> Fragmento sintético de ADN

<400> 37

    tttttctaga ttgacagcta gctcagtcct aggtataatg ctagcactag tgtttaaacc   60

50  ccc   63

<210> 38
<211> 65
<212> ADN
55  <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético DE118

60  <400> 38

```

ES 2 639 413 T3

	<b>tgtcccatgt gttgggaggg gcctttttta cctggagata tgactgtgta ggctggagct</b>	<b>60</b>
	<b>gcttc</b>	<b>65</b>
5	<210> 39 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sintético DE119  <400> 39	
	<b>tgtcccatgt gttgggaggg gcctttttta cctggagata tgactgtgta ggctggagct</b>	<b>60</b>
	<b>gcttc</b>	<b>65</b>
15	<210> 40 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador sintético DE122  <400> 40	
	<b>gtttgagcag gctatgatta aggaaggatt ttccaggagg aacacgtgta ggctggagct</b>	<b>60</b>
25	<b>gcttc</b>	<b>65</b>
30	<210> 41 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador sintético DE123  <400> 41	
	<b>tatttgtaa cagcacgta ctcgcccgga agccgctctg gcaagatggg aattagccat</b>	<b>60</b>
	<b>gggcc</b>	<b>65</b>
40	<210> 42 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador sintético DE106  <400> 42	
	<b>gtgttttctt attactttca aggtcttgca cttggggcgg ctatggtgta ggctggagct</b>	<b>60</b>
50	<b>gcttc</b>	<b>65</b>
	<210> 43 <211> 65	

ES 2 639 413 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Cebador sintético DE107  
  
 <400> 43  
  
**ctaactgaac aaggcttgtg catgagcaat accgtctctc gccagatggg aattagccat 60**  
  
**ggtcc 65**  
 10  
 <210> 44  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Cebador sintético MS286  
  
 <400> 44  
 20  
**ccgtttatgt tgccagacag cgctactgat taagcggatt ttttogcttt catatgaata 60**  
  
**tcctccttag t 71**  
  
 <210> 45  
 <211> 70  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético MS287  
 30  
 <400> 45  
  
**cgagcagatg atttactaaa aaagttaaac attatcagga gagcattatg gtgtaggctg 60**  
  
**gagctgcttc 70**  
 35  
 <210> 46  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Cebador sintético MS289  
  
 <400> 46  
  
**tggctcctg acgttttttt agccacgtat caattatagg tacttccatg gtgtaggctg 60**  
  
  
 45 **gagctgcttc**  
  
 <210> 47  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético MS290

ES 2 639 413 T3

	<400> 47	
	<b>gcagcgcaaa gctgcggatg atgacgagat tactgctgct gtgcagactg catatgaata</b>	<b>60</b>
5	<b>tcctccttag t</b>	<b>71</b>
	<210> 48 <211> 71 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sintético MS292	
15	<400> 48	
	<b>ctccccctgga atgcagggga gcggcaagat taaaccagtt cgttcgggca catatgaata</b>	<b>60</b>
	<b>tcctccttag t</b>	<b>71</b>
20	<210> 49 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador sintético MS293	
	<400> 49	
	<b>tatttttagt agcttaaagt tgattcaaca tcaactggaga aagtcttatg gtgtaggctg</b>	<b>60</b>
	<b>gagctgcttc</b>	<b>70</b>
30	<210> 50 <211> 48 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador sintético FS011	
40	<400> 50 tcccctagga ttcaggaggt tttatggag tggaagaga tatataaa 48	
45	<210> 51 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador sintético FS008	
55	<400>51 ccttaagtgc acaaattcta aaatctctt ttaaattc 38	
	<210> 52 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético JRG047	

# ES 2 639 413 T3

<400> 52  
 ttcaggatcc tgcgcatgct agctatagtt ctagaggta 39

5 <210> 53  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador sintético JRG048

<400> 53  
 catacgatag ctcataaaaa cctcctcgca gttagcgaat agaaaagccg ttg 53

15 <210> 54  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador sintético JRG049

25 <400> 54  
 gaggaggttt ttatgagcta tcgtatgagc tatcgtatgt ttgattatct ggtgc 55

30 <210> 55  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Cebador sintético JRG050

<400> 55  
 tcttcatga actcagaatg cctggcggaa aatcg 35

40 <210> 56  
 <211> 1053  
 <212> ADN  
 <213> *Aspergillus terreus*

<400> 56

ES 2 639 413 T3

atgccactgg ttgctcaaaa tccactgccca cgtgctatcc tgggtctgat gactttcggg 60  
 ccgagcgaaa gcaaagggtgc gcgtatcact tccctggatg agtttaacaa gtgcctggat 120  
 tacttccagc agcagggtt ccaggaaatc gataccgcgc gcatctacgt cggcggtgaa 180  
 caggaggcat tcacggcgca ggcaaagtgg aaagaacgcg gcctgacgct ggcgactaag 240  
 tggatccgc agtaccggg tgcgcacaaa ccggatgtcc tgcgtcagaa cctggagctg 300  
 tccctgaaag aactgggcac gaaccagtc gatattctt atctgcacgc cgcggatcgt 360  
 tctgtgccgt tcgcggaac tctggaaact gttaacgaac tgcacaaaga aggcaaattt 420  
 gttcagctgg gtctgtctaa ctacaccgct ttcgaagtag ctgaaatcgt gaccctgtgt 480  
 aacgagcgtg gttgggttcg tccgactatc taccaggcga tgtataacgc tatcaccgct 540  
 aacatcgaaa ctgaactgat cccggcgtgc aagcgttacg gtattgacat tgttatctac 600  
 aaccactgg cgggtggcct gttcagcggc aaatacaaag cacaggacat cccggctgaa 660  
 ggtcgttaca gcgaccaatc ttccatgggc cagatgtacc gcaaccgta ctttaaggac 720  
 gcaacctttg acgctctgcg cctgatcgaa ccggttgttg cgaagcacgg cctgacgatg 780  
 ccgaaaaccg cgttccgctg ggtccaccac cactccgcac tgaacatgga agatggcggc 840  
 cgtgacggca tcattctggg tgtaagcagc ctggctcagc tggaaaacaa cctgaaagac 900  
 attcagaaaag gtccgctgcc gcaggaggt gtagacgtcc tggatcaggc ttggctggtg 960  
 gctaagccga cggtccaaa ctactggcat ctggacctga aatacacgta cgacaccag 1020  
 gaagctctgt tcaaaccgaa atctaaggcg taa 1053

<210> 57  
 <211> 350  
 <212> PRT  
 <213> *Aspergillus terreus*

5

<400> 57

Met Pro Leu Val Ala Gln Asn Pro Leu Pro Arg Ala Ile Leu Gly Leu  
 1 5 10 15

Met Thr Phe Gly Pro Ser Glu Ser Lys Gly Ala Arg Ile Thr Ser Leu  
 20 25 30

Asp Glu Phe Asn Lys Cys Leu Asp Tyr Phe Gln Gln Gln Gly Phe Gln  
 35 40 45

Glu Ile Asp Thr Ala Arg Ile Tyr Val Gly Gly Glu Gln Glu Ala Phe

10

ES 2 639 413 T3

Thr Ala Gln Ala Lys Trp Lys Glu Arg Gly Leu Thr Leu Ala Thr Lys  
 65 70 75 80  
 Trp Tyr Pro Gln Tyr Pro Gly Ala His Lys Pro Asp Val Leu Arg Gln  
 85 90 95  
 Asn Leu Glu Leu Ser Leu Lys Glu Leu Gly Thr Asn Gln Val Asp Ile  
 100 105 110  
 Phe Tyr Leu His Ala Ala Asp Arg Ser Val Pro Phe Ala Glu Thr Leu  
 115 120 125  
 Glu Thr Val Asn Glu Leu His Lys Glu Gly Lys Phe Val Gln Leu Gly  
 130 135 140  
 Leu Ser Asn Tyr Thr Ala Phe Glu Val Ala Glu Ile Val Thr Leu Cys  
 145 150 155 160  
 Asn Glu Arg Gly Trp Val Arg Pro Thr Ile Tyr Gln Ala Met Tyr Asn  
 165 170 175  
 Ala Ile Thr Arg Asn Ile Glu Thr Glu Leu Ile Pro Ala Cys Lys Arg  
 180 185 190  
 Tyr Gly Ile Asp Ile Val Ile Tyr Asn Pro Leu Ala Gly Gly Leu Phe  
 195 200 205  
 Ser Gly Lys Tyr Lys Ala Gln Asp Ile Pro Ala Glu Gly Arg Tyr Ser  
 210 215 220  
 Asp Gln Ser Ser Met Gly Gln Met Tyr Arg Asn Arg Tyr Phe Lys Asp  
 225 230 235 240  
 Ala Thr Phe Asp Ala Leu Arg Leu Ile Glu Pro Val Val Ala Lys His  
 245 250 255  
 Gly Leu Thr Met Pro Glu Thr Ala Phe Arg Trp Val His His His Ser  
 260 265 270  
 Ala Leu Asn Met Glu Asp Gly Gly Arg Asp Gly Ile Ile Leu Gly Val  
 275 280 285  
 Ser Ser Leu Ala Gln Leu Glu Asn Asn Leu Lys Asp Ile Gln Lys Gly

ES 2 639 413 T3

Pro Leu Pro Gln Glu Val Val Asp Val Leu Asp Gln Ala Trp Leu Val  
 305 310 315 320

Ala Lys Pro Thr Ala Pro Asn Tyr Trp His Leu Asp Leu Lys Tyr Thr  
 325 330 335

Tyr Asp Thr Gln Glu Ala Leu Phe Lys Pro Lys Ser Lys Ala  
 340 345 350

<210> 58  
 <211> 870  
 <212> ADN  
 <213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 58

atggaagtag gtttctggg tctgggcatt atgggtaaag ctatgtccat gaacctgctg 60  
 aaaaacgggt tcaaagttac cgtgtggaac cgcactctgt ctaaagtga tgaactgggt 120  
 gaacacgggt caagcgtgtg cgagtctccg gctgaggtga tcaagaaatg caaatacacg 180  
 atcgcgatgc tgagcgatcc gtgtgcagct ctgtctgttg ttttcgataa aggcgggtgtt 240  
 ctggaacaga tctgcgaggg taagggctac atcgacatgt ctaccgtcga cgcggaaact 300  
 agcctgaaaa ttaacgaagc gatcacgggc aaaggtggcc gttttgtaga aggtcctggt 360  
 agcggttcca aaaagccggc agaagacggc cagctgatca tcctggcagc aggcgacaaa 420  
 gcaactgttcg aggaatccat cccggccttt gatgtactgg gcaaacgttc cttttatctg 480  
 ggtcaggtgg gtaacgggtc gaaaatgaaa ctgattgtta acatgatcat gggttctatg 540  
 atgaacgcgt ttagcgaagg tctggtactg gcagataaaa gcggtctgtc tagcgacacg 600  
 ctgctggata ttctggatct ggggtgctatg acgaatccga tgttcaaagg caaaggtccg 660  
 tccatgacta aatccagcta cccaccggct ttcccgtga aacaccagca gaaagacatg 720  
 cgtctggctc tggctctggg cgacgaaaac gctgtagca tgccggctgc tgcggctgcg 780  
 aacgaagcct tcaagaaagc ccgtagcctg ggocctggcg atctggactt ttctgctggt 840  
 atcgaagcgg taaaattctc tcgtgaataa 870

10

<210> 59  
 <211> 289  
 <212> PRT  
 <213> *Arabidopsis thaliana*

15

<400> 59

Met Glu Val Gly Phe Leu Gly Leu Gly Ile Met Gly Lys Ala Met Ser

ES 2 639 413 T3

Met Asn Leu Leu Lys Asn Gly Phe Lys Val Thr Val Trp Asn Arg Thr  
 20 25 30

Leu Ser Lys Cys Asp Glu Leu Val Glu His Gly Ala Ser Val Cys Glu  
 35 40 45

Ser Pro Ala Glu Val Ile Lys Lys Cys Lys Tyr Thr Ile Ala Met Leu  
 50 55 60

Ser Asp Pro Cys Ala Ala Leu Ser Val Val Phe Asp Lys Gly Gly Val  
 65 70 75 80

Leu Glu Gln Ile Cys Glu Gly Lys Gly Tyr Ile Asp Met Ser Thr Val  
 85 90 95

Asp Ala Glu Thr Ser Leu Lys Ile Asn Glu Ala Ile Thr Gly Lys Gly  
 100 105 110

Gly Arg Phe Val Glu Gly Pro Val Ser Gly Ser Lys Lys Pro Ala Glu  
 115 120 125

Asp Gly Gln Leu Ile Ile Leu Ala Ala Gly Asp Lys Ala Leu Phe Glu  
 130 135 140

Glu Ser Ile Pro Ala Phe Asp Val Leu Gly Lys Arg Ser Phe Tyr Leu  
 145 150 155 160

Gly Gln Val Gly Asn Gly Ala Lys Met Lys Leu Ile Val Asn Met Ile  
 165 170 175

Met Gly Ser Met Met Asn Ala Phe Ser Glu Gly Leu Val Leu Ala Asp  
 180 185 190

Lys Ser Gly Leu Ser Ser Asp Thr Leu Leu Asp Ile Leu Asp Leu Gly  
 195 200 205

Ala Met Thr Asn Pro Met Phe Lys Gly Lys Gly Pro Ser Met Thr Lys  
 210 215 220

Ser Ser Tyr Pro Pro Ala Phe Pro Leu Lys His Gln Gln Lys Asp Met  
 225 230 235 240

Arg Leu Ala Leu Ala Leu Gly Asp Glu Asn Ala Val Ser Met Pro Val

ES 2 639 413 T3

Ala Ala Ala Ala Asn Glu Ala Phe Lys Lys Ala Arg Ser Leu Gly Leu  
 260 265 270

Gly Asp Leu Asp Phe Ser Ala Val Ile Glu Ala Val Lys Phe Ser Arg  
 275 280 285

Glu

<210> 60  
 <211> 1680  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Genes de fusión phaC3/C5 de polihidroxialcanoato sintasa de *Pseudomonas putida*/*Zoogloea ramigera* sintéticos

<400> 60

atgagtaaca agaacaacga tgagctgcag tggcaatcct gggtcagcaa ggcgcccacc 60  
 accgaggcga acccgatggc caccatggtg caggatatcg gcgttgcgct caaacccgaa 120  
 gcgatggagc agctgaaaaa cgattatctg cgtgacttca ccgcggttg gacagatttt 180  
 ttggctggca aggcgccagc cgtcagcgc acgcgcttca gctcggcagc ctggcagggc 240  
 aatccgatgt cggccttcaa tgccgcactc tacctgctca acgccaatt cctcagtgcc 300  
 atggtggagg cgggtggacac cgcaccccag caaaagcaga aaatacgctt tgccgtgcag 360  
 caggtgattg atgccatgtc gcccgcgaaac ttctctcgca ccaaccgga agcgcagcaa 420  
 aaactgattg aaaccaaggg cgagagcctg acgcgtggcc tggtaaatat gctgggcgat 480  
 atcaacaagg gccatatctc gctgtcggac gaatcggcct ttgaagtggg ccgcaacctg 540  
 gccattacc cgggcaccgt gatttacgaa aatccgctgt tccagctgat ccagtacacg 600  
 ccgaccacgc cgacggtcag ccagcgcacc ctggtgatgg tgccgccgtg catcaacaag 660  
 ttctacatcc tcgacctgca accggaaaat tcgctggtgc gctacgcggt ggagcagggc 720  
 aacaccgtgt tctgatctc gtggagcaat ccggacaagt cgctggccgg caccacctgg 780  
 gacgactacg tggagcaggg cgtgatcgaa gcgatccgca tcgtccagga cgtcagcggc 840  
 caggacaagc tgaacatggt cggcttctgc gtgggcggca ccatcgttgc caccgactg 900  
 gcggtactgg cggcgcgtgg ccagcaccgc gcggccagcc tgacctget gaccacctc 960  
 ctcgacttca gcgacaccgg cgtgctcgac gtcttcgctc atgaaacca ggtcgcgctg 1020  
 cgtgaacagc aattgcgcga tggcggcctg atgccgggcc gtgacctggc ctcgacctc 1080

ES 2 639 413 T3

tcgagcctgc gtccgaacga cctggtatgg aactatgtgc agtcgaacta cctcaaaggc 1140  
aatgagccgg cggcgtttga cctgctgttc tggaattcgg acagcaccaa tttgccgggc 1200  
ccgatgttct gctggtacct gcgcaacacc tacctggaaa acagcctgaa agtgccgggc 1260  
aagctgacgg tggccggcga aaagatcgac ctccggcctga tcgacgcccc gcccttcac 1320  
tacggttcgc gcgaagacca catcgtgccg tggatgtcgg cgtacggttc gctcgacac 1380  
ctcaaccagg gcaagccggg cgccaaccgc ttcgtgctgg gcgctccgg ccatatcgcc 1440  
ggcgtgatca actcgggtggc caagaacaag cgcagctact ggatcaacga cggtgccgcc 1500  
gccgatgccc aggccctggtt cgatggcgcg caggaagtgc cgggcagctg gtggccgcaa 1560  
tgggcccgggt tcttgaccca gcatggcggc aagaagggtca agcccaaggc caagcccggc 1620  
aacgcccgct acaccgcgat cgaggcggcg cccggccgtt acgtcaaagc caagggtga 1680

<210> 61  
<211> 559  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos sintética: genes de fusión PhaC3/C5 de polihidroxicanoato sintasa de *Pseudomonas putida*/*Zoogloea ramigera*

<400> 61

Met Ser Asn Lys Asn Asn Asp Glu Leu Gln Trp Gln Ser Trp Phe Ser  
1 5 10 15

Lys Ala Pro Thr Thr Glu Ala Asn Pro Met Ala Thr Met Leu Gln Asp  
20 25 30

Ile Gly Val Ala Leu Lys Pro Glu Ala Met Glu Gln Leu Lys Asn Asp  
35 40 45

Tyr Leu Arg Asp Phe Thr Ala Leu Trp Gln Asp Phe Leu Ala Gly Lys  
50 55 60

Ala Pro Ala Val Ser Asp Arg Arg Phe Ser Ser Ala Ala Trp Gln Gly  
65 70 75 80

Asn Pro Met Ser Ala Phe Asn Ala Ala Ser Tyr Leu Leu Asn Ala Lys  
85 90 95

Phe Leu Ser Ala Met Val Glu Ala Val Asp Thr Ala Pro Gln Gln Lys  
100 105 110

ES 2 639 413 T3

Gln Lys Ile Arg Phe Ala Val Gln Gln Val Ile Asp Ala Met Ser Pro  
115 120 125

Ala Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Gln Lys Leu Ile Glu  
130 135 140

Thr Lys Gly Glu Ser Leu Thr Arg Gly Leu Val Asn Met Leu Gly Asp  
145 150 155 160

Ile Asn Lys Gly His Ile Ser Leu Ser Asp Glu Ser Ala Phe Glu Val  
165 170 175

Gly Arg Asn Leu Ala Ile Thr Pro Gly Thr Val Ile Tyr Glu Asn Pro  
180 185 190

Leu Phe Gln Leu Ile Gln Tyr Thr Pro Thr Thr Pro Thr Val Ser Gln  
195 200 205

Arg Pro Leu Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Phe Tyr Ile Leu  
210 215 220

Asp Leu Gln Pro Glu Asn Ser Leu Val Arg Tyr Ala Val Glu Gln Gly  
225 230 235 240

Asn Thr Val Phe Leu Ile Ser Trp Ser Asn Pro Asp Lys Ser Leu Ala  
245 250 255

Gly Thr Thr Trp Asp Asp Tyr Val Glu Gln Gly Val Ile Glu Ala Ile  
260 265 270

Arg Ile Val Gln Asp Val Ser Gly Gln Asp Lys Leu Asn Met Phe Gly  
275 280 285

Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile Val Ala Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala  
290 295 300

Ala Arg Gly Gln His Pro Ala Ala Ser Leu Thr Leu Leu Thr Thr Phe  
305 310 315 320

Leu Asp Phe Ser Asp Thr Gly Val Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Thr  
325 330 335

Gln Val Ala Leu Arg Glu Gln Gln Leu Arg Asp Gly Gly Leu Met Pro  
340 345 350

ES 2 639 413 T3

Gly Arg Asp Leu Ala Ser Thr Phe Ser Ser Leu Arg Pro Asn Asp Leu  
 355 360 365

Val Trp Asn Tyr Val Gln Ser Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Pro Ala  
 370 375 380

Ala Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn Ser Asp Ser Thr Asn Leu Pro Gly  
 385 390 395 400

Pro Met Phe Cys Trp Tyr Leu Arg Asn Thr Tyr Leu Glu Asn Ser Leu  
 405 410 415

Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Ala Gly Glu Lys Ile Asp Leu Gly  
 420 425 430

Leu Ile Asp Ala Pro Ala Phe Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp His Ile  
 435 440 445

Val Pro Trp Met Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Asp Ile Leu Asn Gln Gly  
 450 455 460

Lys Pro Gly Ala Asn Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala  
 465 470 475 480

Gly Val Ile Asn Ser Val Ala Lys Asn Lys Arg Ser Tyr Trp Ile Asn  
 485 490 495

Asp Gly Gly Ala Ala Asp Ala Gln Ala Trp Phe Asp Gly Ala Gln Glu  
 500 505 510

Val Pro Gly Ser Trp Trp Pro Gln Trp Ala Gly Phe Leu Thr Gln His  
 515 520 525

Gly Gly Lys Lys Val Lys Pro Lys Ala Lys Pro Gly Asn Ala Arg Tyr  
 530 535 540

Thr Ala Ile Glu Ala Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys Gly  
 545 550 555

<210> 62  
 <211> 1152  
 <212> ADN  
 <213> *Thiocapsa phenigii*

ES 2 639 413 T3

<400> 62

```

atggctgggtg accacgtcgt ggaatgcctt cgaattcagg aggtttttat gaacgatacg      60
gccaacaaga ccagcgactg gctggacatc caacgcaagt actgggagac ctggtcggag      120
ctcggccgca agacottggg tctggagaag accccggcca atccttgggc cggcgccctc      180
gatcattggt ggcagacggt ctcgcccgcc gcccacaacg acctggttcg cgacttcatg      240
gagaagctcg ccgagcaggg caaggccttc ttcggcctca ccgactactt cacgaagggc      300
ctcggcggca gtagcggtac gcagggctgg gacaccctct cgaagaccat cgacgacatg      360
caaaaggcct tcgccagcgg ccggatcgaa ggcgacgaga ccttcgcccg cctgatggcc      420
ttctgggaga tggcgctcga caactggcag cgcaccatgt cctcgtgtc cccggtgccc      480
ggcgacctgc tgcgcaacat gccgcacgac caagtcaagg acagcgtcga ccgcatcctc      540
tcggcacccg ggctcggcta cacgcgcgag gagcaggccc gctaccagga tctgatccgc      600
cgctcgtctg agtaccagtc ggccctgaac gaatacaacg gcttcttcgg ccagctcggg      660
gtcaagtccc tcgagcggat gcgcgccttc ctgcagggac aggccgagaa gggcgtcggc      720
atcgagtccg cgcgcaccct ctacgacgcc tgggtcggct gctgcgaaga ggtctatgcc      780
gaggaggtca gctccgccga ctacgcgcac atccacggcc gcctcgtcaa cggccagatg      840
gccctcaagc agcgcgatgtc gaccatggtc gacgaggtcc tcggcgcgat gccgctgccg      900
accgcagcgg agctgogcac gctccaggat cggctccagg agtcgcgcgg cgagggcaag      960
cgccagcggc aagagatcga gacgctgaag cggcaggtcg cggccttggc cggcggcgcc     1020
cagcccgcgc cccaggcctc cgcccagccc agcaccggc ccgcgccggc gacggccccg     1080
gcgggcgagcg cggcgcccaa gcgcagcacc acgaccggcc gcaagaccac caagcccacc     1140
accggccagt ga                                                                1152

```

- 5 <210> 63
- <211> 367
- <212> PRT
- <213> *Thiocapsa phenigii*

10 <400> 63



ES 2 639 413 T3

50						55						60					
Glu	Lys	Leu	Ala	Glu	Gln	Gly	Lys	Ala	Phe	Phe	Gly	Leu	Thr	Asp	Tyr		
65					70					75					80		
Phe	Thr	Lys	Gly	Leu	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Thr	Gln	Gly	Trp	Asp	Thr		
				85					90					95			
Leu	Ser	Lys	Thr	Ile	Asp	Asp	Met	Gln	Lys	Ala	Phe	Ala	Ser	Gly	Arg		
			100					105					110				
Ile	Glu	Gly	Asp	Glu	Thr	Phe	Arg	Arg	Leu	Met	Ala	Phe	Trp	Glu	Met		
		115					120					125					
Pro	Leu	Asp	Asn	Trp	Gln	Arg	Thr	Met	Ser	Ser	Leu	Ser	Pro	Val	Pro		
	130					135					140						
Gly	Asp	Leu	Leu	Arg	Asn	Met	Pro	His	Asp	Gln	Val	Arg	Asp	Ser	Val		
145					150					155					160		
Asp	Arg	Ile	Leu	Ser	Ala	Pro	Gly	Leu	Gly	Tyr	Thr	Arg	Glu	Glu	Gln		
				165					170					175			
Ala	Arg	Tyr	Gln	Asp	Leu	Ile	Arg	Arg	Ser	Leu	Glu	Tyr	Gln	Ser	Ala		
			180					185					190				
Leu	Asn	Glu	Tyr	Asn	Gly	Phe	Phe	Gly	Gln	Leu	Gly	Val	Lys	Ser	Leu		
		195					200					205					
Glu	Arg	Met	Arg	Ala	Phe	Leu	Gln	Gly	Gln	Ala	Glu	Lys	Gly	Val	Ala		
	210					215					220						
Ile	Glu	Ser	Ala	Arg	Thr	Leu	Tyr	Asp	Ala	Trp	Val	Gly	Cys	Cys	Glu		
225					230					235					240		
Glu	Val	Tyr	Ala	Glu	Glu	Val	Ser	Ser	Ala	Asp	Tyr	Ala	His	Ile	His		
				245					250					255			
Gly	Arg	Leu	Val	Asn	Ala	Gln	Met	Ala	Leu	Lys	Gln	Arg	Met	Ser	Thr		
			260					265					270				
Met	Val	Asp	Glu	Val	Leu	Gly	Ala	Met	Pro	Leu	Pro	Thr	Arg	Ser	Glu		
		275					280					285					
Leu	Arg	Thr	Leu	Gln	Asp	Arg	Leu	Gln	Glu	Ser	Arg	Gly	Glu	Gly	Lys		

ES 2 639 413 T3

290	295	300															
Arg	Gln	Arg	Gln	Glu	Ile	Glu	Thr	Leu	Lys	Arg	Gln	Val	Ala	Ala	Leu		
305					310					315					320		
Ala	Gly	Gly	Ala	Gln	Pro	Ala	Pro	Gln	Ala	Ser	Ala	Gln	Pro	Ser	Thr		
				325					330					335			
Arg	Pro	Ala	Pro	Ala	Thr	Ala	Pro	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Lys	Arg		
			340					345					350				
Ser	Thr	Thr	Thr	Arg	Arg	Lys	Thr	Thr	Lys	Pro	Thr	Thr	Gly	Gln			
		355					360						365				

<210> 64  
 <211> 1074  
 <212> ADN  
 <213> *Thiocapsa phenigii*  
 <400> 64

5

```

atgtcccat tccgatcga catccggccc gacaagctga ccgaggagat gctggagtac      60
agccgcaagc tcggcgaggg tatgcagaac ctgctcaagg ccgaccagat cgacacaggc     120
gtcaccceca aggacgtcgt ccaccgcgag gacaagctgg tcctctaccg ctaccggcgc      180
ccggcgagcagg tggcgacca gacgatcccg ctgctgatcg tctacgcctt cgtcaatcgg     240
ccctacatga ccgacatcca ggaggatcgc tcgacgatca agggcctgct cgccaccggt      300
caggacgtct atctgatcga ctggggctac ccggatcagg ccgaccgggc gctgaccctc     360
gatgactaca tcaacggcta catcgaccgc tgcgtcgact acctgcgcca gaccacggc      420
gtcgaccagg tcaacctgct cgggatctgc cagggcgggg ccttcagcct ctgctacacg     480
gccctgcact ccgagaaggt caaaaacctc gtcaccatgg tcacgccggg cgacttccag      540
accccgggca acctgctctc ggccctgggtc cagaacgtcg acgtcgacct ggccgtcgac     600
accatgggca acatcccggg cgaactgctc aactggacct tcctgtcgct caagcccttc     660
agcctgaccg gccagaagta cgtcaacatg gtcgacctgc tcgacgacga ggacaaggtc      720
aagaacttcc tgcggatgga gaagtggatc ttcgacagcc cggaccaggc cggcgagacc     780
ttccgccagt tcatcaagga cttctaccag cgcaacggct tcatcaacgg cggcgtcctg     840
atcggcgatc aggaggtcga cctgcgcaac atccgctgcc cggtcctgaa catctaccgg     900
atgcaggacc acctggtgcc gccggatgcc tccaaggccc tcgcgggact gacctccagc     960
gaggactaca cggagctcgc cttccccggc gggcacatcg gcatctacgt cagcggcaag    1020
gcgcaggaag gagtcacccc ggcgatcggc cgctggctga acgaacgcgg ctga          1074
    
```

10

<210> 65  
 <211> 357

ES 2 639 413 T3

<212> PRT

<213> *Thiocapsa phenigii*

<400> 65

5

Met	Ser	Pro	Phe	Pro	Ile	Asp	Ile	Arg	Pro	Asp	Lys	Leu	Thr	Glu	Glu
1				5					10					15	
Met	Leu	Glu	Tyr	Ser	Arg	Lys	Leu	Gly	Glu	Gly	Met	Gln	Asn	Leu	Leu
			20					25					30		
Lys	Ala	Asp	Gln	Ile	Asp	Thr	Gly	Val	Thr	Pro	Lys	Asp	Val	Val	His
		35					40					45			
Arg	Glu	Asp	Lys	Leu	Val	Leu	Tyr	Arg	Tyr	Arg	Arg	Pro	Ala	Gln	Val
	50					55					60				
Ala	Thr	Gln	Thr	Ile	Pro	Leu	Leu	Ile	Val	Tyr	Ala	Leu	Val	Asn	Arg
65					70					75					80
Pro	Tyr	Met	Thr	Asp	Ile	Gln	Glu	Asp	Arg	Ser	Thr	Ile	Lys	Gly	Leu
				85					90					95	
Leu	Ala	Thr	Gly	Gln	Asp	Val	Tyr	Leu	Ile	Asp	Trp	Gly	Tyr	Pro	Asp
			100					105					110		
Gln	Ala	Asp	Arg	Ala	Leu	Thr	Leu	Asp	Asp	Tyr	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile
		115					120					125			
Asp	Arg	Cys	Val	Asp	Tyr	Leu	Arg	Glu	Thr	His	Gly	Val	Asp	Gln	Val
	130					135					140				
Asn	Leu	Leu	Gly	Ile	Cys	Gln	Gly	Gly	Ala	Phe	Ser	Leu	Cys	Tyr	Thr
145					150					155					160
Ala	Leu	His	Ser	Glu	Lys	Val	Lys	Asn	Leu	Val	Thr	Met	Val	Thr	Pro
				165					170					175	
Val	Asp	Phe	Gln	Thr	Pro	Gly	Asn	Leu	Leu	Ser	Ala	Trp	Val	Gln	Asn
			180					185					190		
Val	Asp	Val	Asp	Leu	Ala	Val	Asp	Thr	Met	Gly	Asn	Ile	Pro	Gly	Glu
		195					200					205			

ES 2 639 413 T3

Leu Leu Asn Trp Thr Phe Leu Ser Leu Lys Pro Phe Ser Leu Thr Gly  
 210 215 220

Gln Lys Tyr Val Asn Met Val Asp Leu Leu Asp Asp Glu Asp Lys Val  
 225 230 235 240

Lys Asn Phe Leu Arg Met Glu Lys Trp Ile Phe Asp Ser Pro Asp Gln  
 245 250 255

Ala Gly Glu Thr Phe Arg Gln Phe Ile Lys Asp Phe Tyr Gln Arg Asn  
 260 265 270

Gly Phe Ile Asn Gly Gly Val Leu Ile Gly Asp Gln Glu Val Asp Leu  
 275 280 285

Arg Asn Ile Arg Cys Pro Val Leu Asn Ile Tyr Pro Met Gln Asp His  
 290 295 300

Leu Val Pro Pro Asp Ala Ser Lys Ala Leu Ala Gly Leu Thr Ser Ser  
 305 310 315 320

Glu Asp Tyr Thr Glu Leu Ala Phe Pro Gly Gly His Ile Gly Ile Tyr  
 325 330 335

Val Ser Gly Lys Ala Gln Glu Gly Val Thr Pro Ala Ile Gly Arg Trp  
 340 345 350

Leu Asn Glu Arg Gly  
 355

## REIVINDICACIONES

1. Un organismo no humano recombinante modificado por ingeniería genética para convertir 5-aminopentanoato en un polímero de polihidroxicanoato (PHA) o en un copolímero del mismo que comprende 5-hidroxicanoato,
  - 5 en el que la ruta para convertir el 5-aminopentanoato en PHA que comprende 5-hidroxicanoato comprende 5-aminopentanoato transaminasa ( $\delta$ -aminovalerato transaminasa), EC 2.6.1.48; succinato semialdehído reductasa (también conocida como glutarato semialdehído reductasa), EC 1.1.1.61; CoA-transferasa, EC 2.8.3.14 y EC 2.8.3.n o Acil-CoA sintetasa, EC 6.2.1.3; y PHA sintasa, EC 2.3.1.n; y
  - 10 en el que el organismo recombinante produce el PHA que comprende 5-hidroxicanoato a partir de lisina, en el que el organismo recombinante está modificado por ingeniería genética para expresar al menos uno o más genes que codifican una o más enzimas para la producción del PHA que comprende 5-hidroxicanoato a partir de lisina, en el que las enzimas se seleccionan del grupo que consiste en: lisina 2-monooxigenasa, EC 1.13.12.2; 5-aminopentanamidasas ( $\delta$ -aminovaleramidasas), EC 3.5.1.30; 5-aminopentanoato transaminasa ( $\delta$ -aminovalerato transaminasa), EC 2.6.1.48; succinato semialdehído reductasa (también conocida como glutarato semialdehído reductasa), EC 1.1.1.61; CoA-transferasa, EC 2.8.3.14 y EC 2.8.3.n; Acil-CoA sintetasa, EC 6.2.1.3; PHA sintasa, EC 2.3.1.n,
  - 15 en el que el 5-aminopentanoato se convierte en 5-hidroxicanoato, y en el que el 5-hidroxicanoato se convierte en un polímero de PHA o en un copolímero del mismo por medio del organismo recombinante.
2. El organismo recombinante de cualquier reivindicación anterior, en el que el organismo recombinante expresa al menos uno o más genes que codifican una o más enzimas seleccionadas de  $\beta$ -cetoacil-CoA tiasa, EC 2.3.1.9 y acetacetil-CoA reductasa, EC 1.1.1.36.
3. El organismo recombinante de cualquier reivindicación anterior, en el que PHA es un polímero de monómeros de 5-hidroxicanoato o un copolímero de polímero de 5-hidroxicanoato, tal como poli(3-hidroxicanoato-co-5-hidroxicanoato).
- 25 4. El organismo recombinante de cualquier reivindicación anterior, en el que el organismo recombinante convierte lisina en 5-aminopentanoato.
5. El organismo recombinante de cualquier reivindicación anterior, en el que el organismo que se utiliza para construir el organismo recombinante se ha modificado para sobreproducir lisina con respecto a un organismo no modificado.
- 30 6. El organismo recombinante de cualquier reivindicación anterior, en el que el organismo recombinante es resistente al análogo tóxico de lisina S-(2-aminoetil) cisteína, en el que el organismo recombinante expresa una dihidrodipicolinato sintasa resistente a la retroalimentación por lisina, en el que el organismo recombinante expresa una aspartato quinasa III resistente a la retroalimentación por lisina, y/o en el que el organismo recombinante se modifica adicionalmente por ingeniería genética para inhibir o bloquear la exportación de lisina.
- 35 7. El organismo recombinante de cualquier reivindicación anterior, en el que el organismo se ha modificado para reducir o eliminar la actividad de glutarato semialdehído deshidrogenasa, preferentemente en el que la glutarato semialdehído deshidrogenasa se reduce o elimina por eliminación o alteración de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *davD*, *ynel* y *gabD* o sus homólogos.
- 40 8. El organismo recombinante de cualquier reivindicación anterior, en el que el organismo recombinante convierte el 5-hidroxicanoato en 5-hidroxicanoato CoA y/o convierte el 5-hidroxicanoato-CoA en un polihidroxicanoato, tal como poli(5-hidroxicanoato) o en un copolímero del mismo, por ejemplo, un copolímero seleccionado de poli(3-hidroxicanoato-co-5HV), poli(3-hidroxicanoato-co-5HV) y poli(4-hidroxicanoato-co-5HV).
9. El organismo recombinante de cualquier reivindicación anterior, en el que el organismo recombinante es procarionte, tal como *E. coli*, o es un microorganismo eucariote.
- 45 10. Un organismo no humano recombinante, de acuerdo con la reivindicación 1, para la producción de polímeros de polihidroxicanoato (PHA) que comprenden monómeros de 5-hidroxicanoato a partir de lisina, en el que el organismo recombinante se modifica por ingeniería genética para expresar al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en lisina 2-monooxigenasa, EC 1.13.12.2; 5-aminopentanamidasas ( $\delta$ -aminovaleramidasas), EC 3.5.1.30; 5-aminopentanoato transaminasa ( $\delta$ -aminovalerato transaminasa), EC 2.6.1.48; succinato semialdehído reductasa (también conocida como glutarato semialdehído reductasa), EC 1.1.1.61; CoA-transferasa, EC 2.8.3.14 y EC 2.8.3.n; Acil-CoA sintetasa, EC 6.2.1.3; PHA sintasa, EC 2.3.1.n para la producción de un polihidroxicanoato que comprende monómeros de 5-hidroxicanoato, y en el que el organismo recombinante no produce lisina, y/o no expresa una actividad enzimática funcional de glutarato semialdehído deshidrogenasa.
- 50 11. Un procedimiento de producción de polímeros de polihidroxicanoato (PHA) basado en 5 átomos de carbono, o de copolímeros del mismo, comprendiendo el procedimiento
- 55

proporcionar lisina u otra materia prima de carbono renovable a células modificadas por ingeniería genética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10; y opcionalmente, en el que:

- 5
- (i) la materia prima de carbono renovable se selecciona entre almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa y arabinosa, o combinaciones de las mismas; y/o
  - (ii) el polihidroxicanoato comprende 5-hidroxivalerato, por ejemplo, poli(5-hidroxivalerato), poli(3-hidroxipropionato-co-5HV), poli(3-hidroxibutirato-co-5HV) o poli(4-hidroxibutirato-co-5HV),

y opcionalmente, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de recuperar el polihidroxicanoato, el polímero o copolímero de los mismos, por ejemplo, mediante extracción con disolvente o procesamiento acuoso.

10

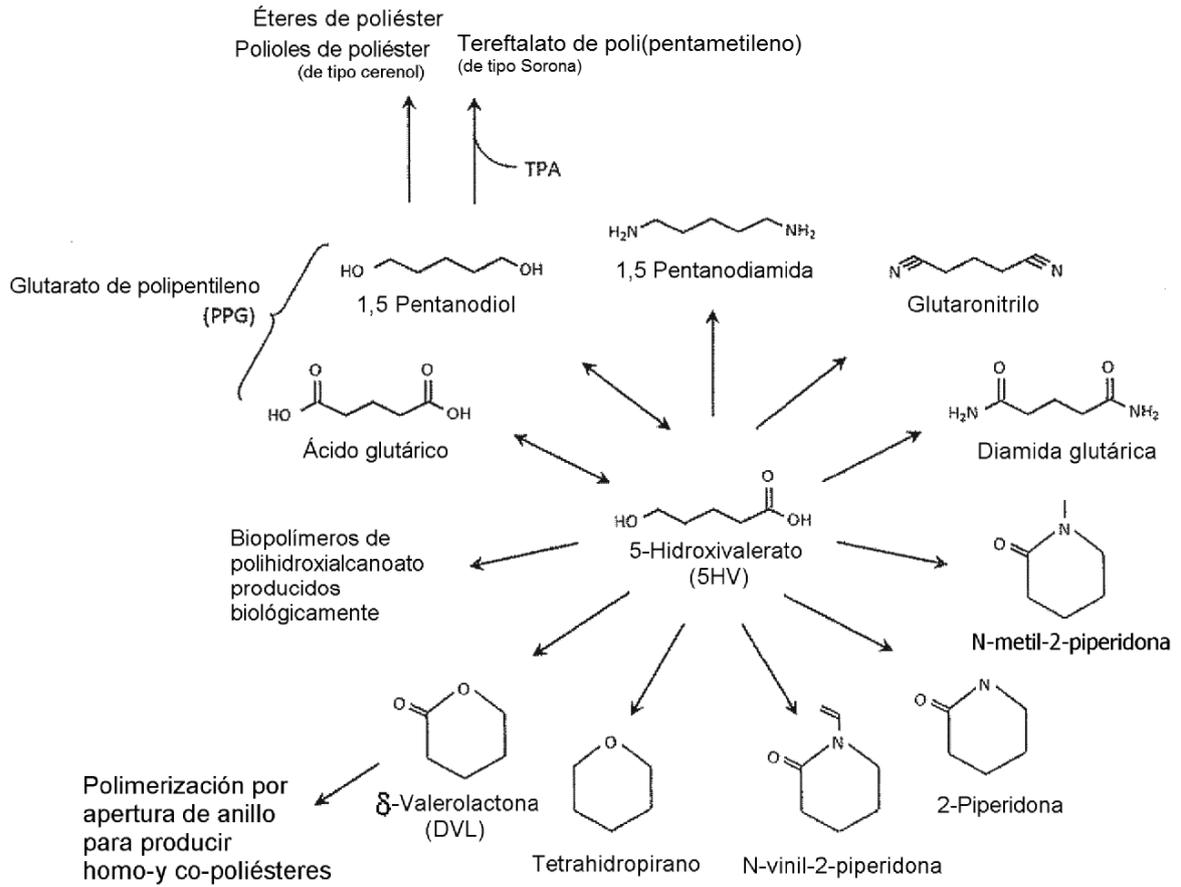


Figura 1



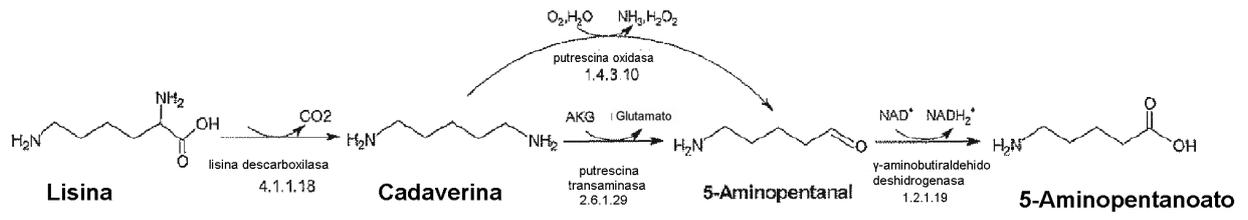


Figura 3

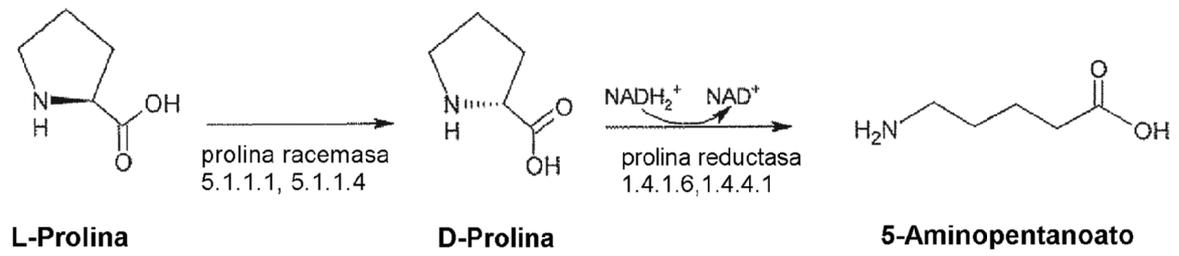


Figura 4

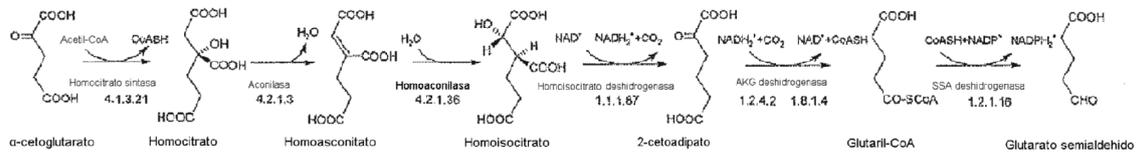


Figura 5

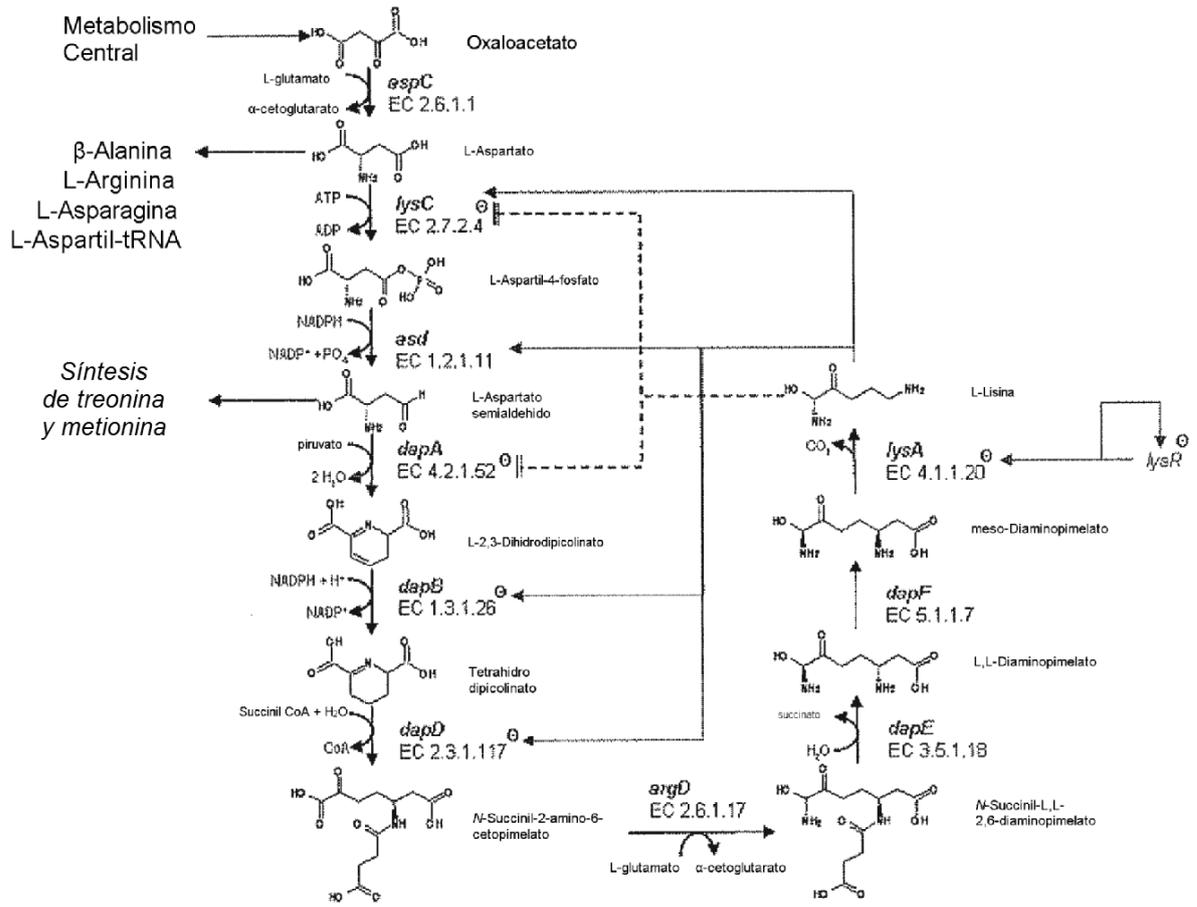


Figura 6

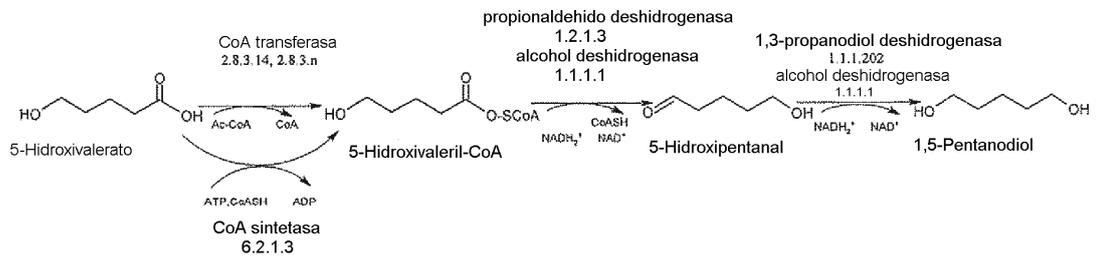
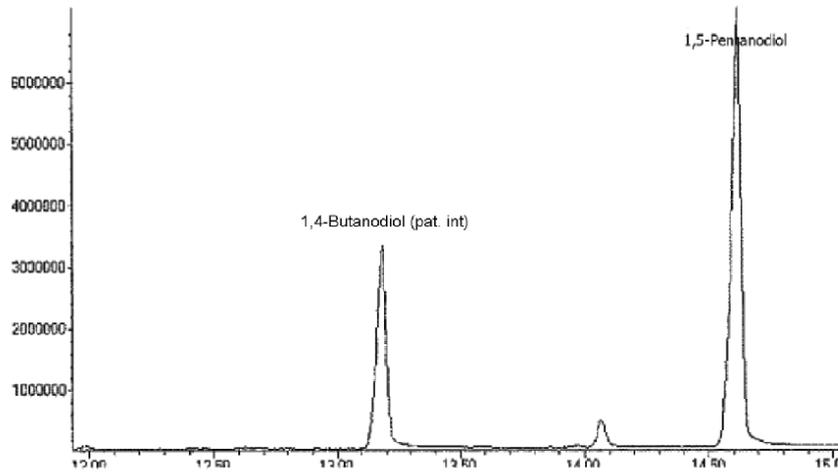


Figura 7

A.



B.

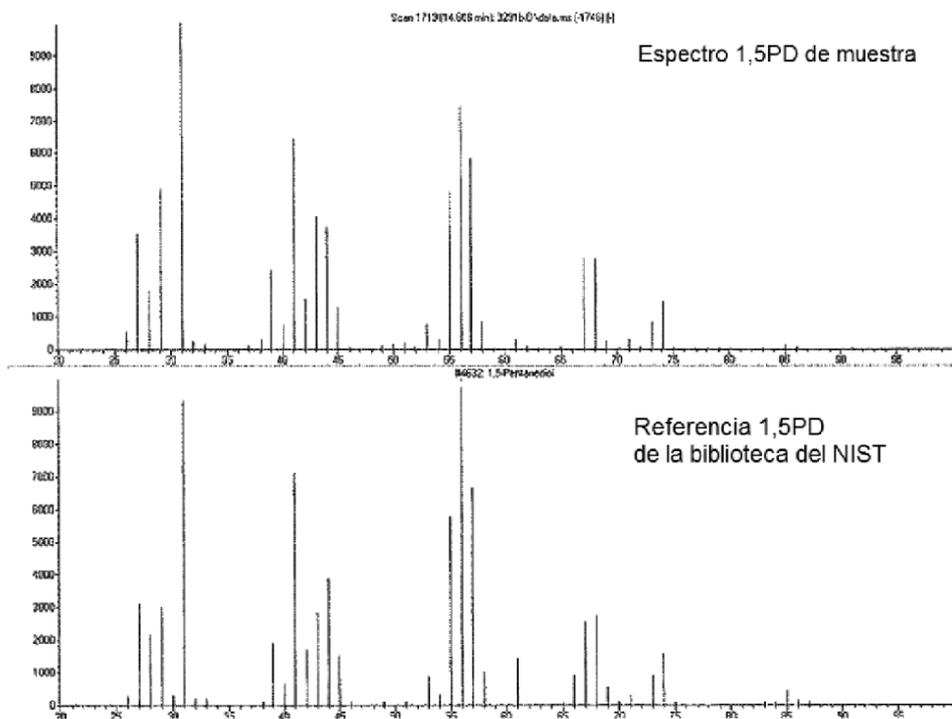


Figura 8