

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 689 477**

(51) Int. Cl.:

C12P 7/62 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2013 PCT/JP2013/005354**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14038214**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2013 E 13834617 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2848694**

(54) Título: **Método para producir éster del ácido metacrílico**

(30) Prioridad:

**10.09.2012 JP 2012198840
01.08.2013 JP 2013160300
20.08.2013 JP 2013170404**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2018

(73) Titular/es:

**MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION (100.0%)
1-1, Marunouchi 1-chome, Chiyoda-ku
Tokyo 100-8251, JP**

(72) Inventor/es:

**SATO, EIJI;
YU, FUJIO;
MIZUNASHI, WATARU y
NAKAJIMA, EIJI**

(74) Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 689 477 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

Método para producir éster del ácido metacrílico

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para producir éster del ácido metacrílico usando un biocatalizador.

10 **Antecedentes de la técnica**

15 Los ésteres del ácido metacrílico se usan principalmente como materia prima en resinas acrílicas, y se demanda mucho también como monómero en campos tales como pinturas, adhesivos y modificadores de resina. Hay pocos métodos como métodos de fabricación industrial y, por ejemplo, se conocen el método de ACH (cianohidrina de acetona) que usa acetona y cianuro de hidrógeno como materias primas, y el método de oxidación directa que usa isobutileno y alcohol terc-butílico como materias primas. Estos métodos de producción química dependen de materias primas fósiles, y requieren una gran cantidad de energía.

20 En los últimos años, se les ha prestado atención a las tecnologías para producir diversos productos químicos a partir de biomasa como fuente de carbono que sustituye a las materias primas fósiles convencionales desde los puntos de vista de prevención del calentamiento global y protección del medio ambiente. Aunque la producción a partir de materia prima de biomasa también se espera para ésteres del ácido metacrílico, no se ha notificado ningún ejemplo de producción específico a partir de materias primas de biomasa usando un biocatalizador.

25 Por ejemplo, se han propuesto métodos que utilizan microorganismos que existen en la naturaleza para producir ácido 2-hidroxiisobutírico y ácido 3-hidroxiisobutírico que sirven como precursores de ácido metacrílico a partir de una fuente natural tal como azúcar (se remite a los documentos de patente 1 y 2, y documento no de patente 1). Sin embargo, en estos métodos, los procedimientos para deshidratar el precursor y formar ácido metacrílico todavía dependen de técnicas químicas.

30 Además, aunque se han propuesto métodos de formación de ácido metacrílico a partir de glucosa usando microorganismos recombinantes que no existen en la naturaleza y se producen introduciendo una pluralidad de genes de enzimas, estos se combinan con una reacción enzimática ya conocida y una reacción enzimática teórica por analogía a esta, y por tanto no se ha demostrado (se remite a los documentos de patente 3 a 5). En particular, el documento de patente 5 ejemplifica diversos biocatalizadores (hidrolasa, éster de cera sintetasa, alcohol acetiltransferasa) que tiene una actividad de formación de éster general; sin embargo, no está claro si los biocatalizadores ejemplificados tienen actividad de síntesis para éster del ácido metacrílico.

40 Además, el documento de patente 6 da a conocer un método para producir éster del ácido acrílico provocando que la hidrolasa funcione en presencia de acrilil-CoA y alcohol. El mismo documento sugiere que la producción es posible de manera similar también para ésteres del ácido metacrílico. Sin embargo, cuando se tiene en cuenta la diversidad y especificidad de sustrato de los biocatalizadores, simplemente ilustra que la producción de una parte de los ésteres del ácido acrílico es posible con hidrolasa, y no está claro si pueden producirse de manera similar por la hidrolasa ésteres del ácido metacrílico que tienen una estructura diferente. Además, no está nada claro si es posible la producción con otros tipos de biocatalizadores que tienen mecanismos de reacción diferentes. Además, en el caso de la síntesis de ésteres mediante la hidrolasa descrita en el documento de patente 6, se supone que el éster formado se descompondrá mediante la actividad de hidrólisis en primer lugar, y por tanto es bastante improbable como método de producción eficaz.

45 Por otro lado, la alcohol acetiltransferasa se ha conocido como sintetasa de aroma frutal. Identificando los mismos genes de enzimas contenidos en frutas específicas, el documento de patente 7 propone métodos de síntesis de diversos ésteres que son aromas a frutas. Sin embargo, no se ha notificado si pueden sintetizarse ésteres del ácido metacrílico con estas enzimas, y no ha estado nada claro.

50 Tal como se estableció anteriormente, aunque se han hecho unas pocas propuestas o estudios, no hay ningún ejemplo de producción actual de derivados de ácido metacrílico por medio de microorganismos, y por tanto se ha deseado el establecimiento de un método de producción eficaz.

[Documento de patente 1] Documento de publicación internacional PCT n.º WO2007/110394

55 [Documento de patente 2] Documento de publicación internacional PCT n.º WO2008/145737

[Documento de patente 3] Documento de publicación internacional PCT n.º WO2009/135074

[Documento de patente 4] Documento de publicación internacional PCT n.º WO2011/031897

65 [Documento de patente 5] Documento de publicación internacional PCT n.º WO2012/135789

[Documento de patente 6] Documento de publicación internacional PCT n.º WO2007/039415

5 [Documento de patente 7] Documento de publicación internacional PCT n.º WO2000/32789

[Documento de patente 8] Solicitud de patente japonesa no examinada, publicación n.º 2011-200133

[Documento de patente 9] Solicitud de patente japonesa no examinada, publicación n.º H05-64589

10 [Documento de patente 10] Solicitud de patente japonesa no examinada, publicación n.º H10-337185

[Documento de patente 11] Solicitud de patente japonesa no examinada, publicación n.º H10-24867

15 [Documento no de patente 1] Green Chemistry, 2012, 14, 1942-1948

15 [Documento no de patente 2] Methods in Enzymology, 2000, 324, 73-79

[Documento no de patente 3] Botanical Journal of the Linnean Society, 2009, 161, 105-121

20 [Documento no de patente 4] Microbiology, 1999, 145, 2323-2334

Divulgación de la invención

Problemas que van a solucionarse mediante la invención

25 La presente invención tiene el objeto de proporcionar un método para producir éster del ácido metacrílico por medio de un biocatalizador.

30 Medios para solucionar los problemas

30 Se ha encontrado que la alcohol aciltransferasa tiene actividad para sintetizar ésteres del ácido metacrílico, llegando de ese modo a la finalización de la presente invención. Más específicamente, la presente invención es tal como sigue.

35 Según un primer aspecto de la invención, un método para producir éster del ácido metacrílico comprende una etapa de producir metacrilil-CoA a partir de isobutiril-CoA o 3-hidroxiisobutiril-CoA, y una etapa de sintetizar éster del ácido metacrílico provocando que un alcohol o fenol que tiene la fórmula R-OH actúe sobre metacrilil-CoA en presencia de una alcohol aciltransferasa, en la que R representa un grupo hidrocarbonado C1-20 lineal o ramificado de un tipo no cíclico saturado o insaturado o de un tipo cíclico saturado o insaturado. Según un segundo aspecto de la invención, 40 en el método para producir éster del ácido metacrílico tal como se describe en el primer aspecto, el éster del ácido metacrílico se acumula en al menos 0,001 mM.

Según un tercer aspecto de la invención, en el método para producir éster del ácido metacrílico tal como se describe en el primer aspecto, la isobutiril-CoA se produce a partir de ácido 2-oxoisovalérico.

45 Según un cuarto aspecto de la invención, en el método para producir éster del ácido metacrílico tal como se describió en cualquiera de los aspectos anteriores, la alcohol aciltransferasa es de origen vegetal.

50 Según un quinto aspecto de la invención, en el método para producir éster del ácido metacrílico tal como se describe en el cuarto aspecto, la planta pertenece a cualquier orden seleccionado del grupo que consiste en Zingiberales, Rosales, Ericales, Cucurbitales, Brassicales y Laurales.

55 Según un sexto aspecto de la invención, en el método para producir éster del ácido metacrílico tal como se describe en el cuarto aspecto, la planta pertenece a cualquier familia seleccionada del grupo que consiste en Musaceae, Rosaceae, Ericaceae, Actinidiaceae, Cucurbitaceae, Caricaceae y Lauraceae.

Según un séptimo aspecto de la invención, en el método para producir éster del ácido metacrílico tal como se describe en el cuarto aspecto, la planta pertenece a cualquier género seleccionado del grupo que consiste en *Musa*, *Fragaria*, *Malus*, *Prunus*, *Pyrus*, *Vaccinium*, *Actinidia*, *Cucumis*, *Carica* y *Persea*.

60 Según un octavo aspecto de la invención, en el método para producir éster del ácido metacrílico tal como se describe en el cuarto aspecto, la planta es cualquier género seleccionado de *Musa*, *Malus*, *Prunus*, *Pyrus*, *Vaccinium*, *Actinidia*, *Cucumis*, *Carica* y *Persea*.

65 Según un noveno aspecto de la invención, en el método para producir éster del ácido metacrílico tal como se describe en el cuarto aspecto, la planta es cualquier género seleccionado de *Musa*, *Malus*, *Pyrus*, *Actinidia*,

Cucumis, Carica y Persea.

Según un décimo aspecto de la invención, en el método para producir éster del ácido metacrílico tal como se describe en el cuarto aspecto, la planta es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en plátano, fresa, manzana, *Prunus mume*, *Pyrus communis*, arándano, kiwi, melón, papaya y aguacate.

Según un decimoprimer aspecto de la invención, en el método para producir éster del ácido metacrílico tal como se describe en el cuarto aspecto, la planta es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en plátano, manzana, *Prunus mume*, *Pyrus communis*, arándano, kiwi, melón, papaya y aguacate.

Según un decimosegundo aspecto de la invención, en el método para producir éster del ácido metacrílico tal como se describe en el cuarto aspecto, la planta es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en plátano, manzana, *Pyrus communis*, kiwi, melón, papaya y aguacate.

Según un decimotercer aspecto de la invención, el método para producir éster del ácido metacrílico tal como se describe en cualquiera de los aspectos primero a decimosegundo usa un microorganismo modificado genéticamente al que se le ha transferido un gen para expresar alcohol aciltransferasa.

Además, la presente invención es tal como sigue en otro aspecto.

Según un decimocuarto aspecto de la invención, un método para producir éster del ácido metacrílico produce el éster del ácido metacrílico usando un microorganismo que pertenece al género *Rhodococcus*. Las siguientes características opcionales del método para producir ácido metacrílico tal como se describió anteriormente se dan a conocer adicionalmente a continuación en el presente documento:

- El método para producir éster del ácido metacrílico usa un microorganismo que pertenece al género *Rhodococcus* que tiene ADN 16Sr que incluye una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 95 % con la secuencia de nucleótidos de ADN 16Sr mostrada en SEQ ID NO. 31.

- El microorganismo que pertenece al género *Rhodococcus* es *Rhodococcus erythropolis*.

- El método usa una cepa derivada del microorganismo que pertenece al género *Rhodococcus*.

- El microorganismo que pertenece al género *Rhodococcus* es la cepa PR-4 de *Rhodococcus erythropolis* o una cepa derivada de la misma.

- La cepa derivada anterior es una cepa modificada genéticamente que tiene una modificación de al menos una de (a) o (b) mostradas a continuación.

- (a) Modificación mediante introducción del gen de cetoácido ramificado deshidrogenasa y/o gen de acil-CoA deshidrogenasa.

- (b) Modificación de delección o inactivación del gen de enoil-CoA hidratasa, gen de 3-hidroxiisobutiril-CoA hidratasa y/o gen de ácido 3-hidroxiisobutírico deshidrogenasa.

- La cepa derivada anterior tiene un plásmido para la expresión de alcohol aciltransferasa y/o acil-CoA deshidrogenasa.

Efectos de la invención

Por medio de la presente invención, se hace posible la producción de éster del ácido metacrílico por medio de un biocatalizador. Combinando el método de producción de la presente invención con el metabolismo *in vivo*, también puede lograrse la producción fermentativa de éster del ácido metacrílico. Como resultado de lo mismo, la energía, los recursos y la carga para el medio ambiente pueden reducirse notablemente en comparación con un procedimiento de producción química convencional, y se hace posible producir eficazmente éster del ácido metacrílico.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una vista que muestra las etapas de producción a partir de 3-hidroxiisobutiril-CoA para dar éster del ácido metacrílico;

la figura 2 es una vista que muestra las etapas de producción a partir de ácido 2-oxoisovalérico para dar éster del ácido metacrílico;

la figura 3 es una vista que muestra la estructura de un plásmido para la delección del gen homólogo LigD;

la figura 4 es una vista que ilustra un método de preparación para un plásmido para delección génica usando el método In Fusion; y

5 la figura 5 es una vista que muestra las estructuras de los plásmidos para la coexpresión de ACD-AAT.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento, se explicarán modos preferidos para llevar a cabo la presente invención 10 mientras se hace referencia a los dibujos.

1. Método de producción de éster del ácido metacrílico a partir de alcohol aciltransferasa

Éster del ácido metacrílico

15 En la presente invención, el éster del ácido metacrílico es un compuesto expresado por la fórmula 1. En la fórmula 1, R representa un grupo hidrocarbonado C1-20 lineal o ramificado. El grupo hidrocarbonado puede ser de tipo no cíclico saturado o insaturado, o puede ser de tipo cíclico saturado o insaturado. Es preferiblemente un grupo alquilo, grupo aralquilo o grupo arilo no sustituido C1-10 lineal o ramificado. Es más preferiblemente un grupo alquilo C1-8 20 tal como un grupo metilo, grupo etilo, grupo n-propilo, grupo isopropilo, grupo n-butilo, grupo isobutilo, grupo sec-butilo, grupo terc-butilo, grupo n-pentilo, grupo isopentilo, grupo terc-pentilo, grupo n-hexilo, grupo isohexilo, grupo 2-hexilo, grupo dimetilbutilo, grupo etilbutilo, grupo heptilo, grupo octilo, grupo 2-ethylhexilo; un grupo bencilo o un grupo fenilo.

25 CH₂=C(CH₃)COO-R (Fórmula 1)

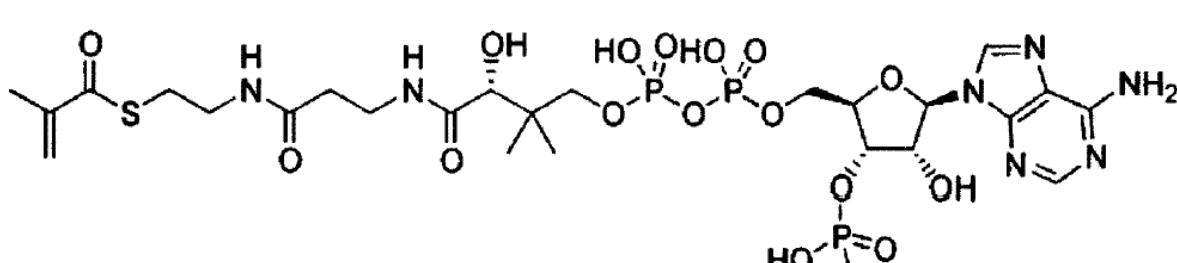
“Ácido metacrílico” (nombre IUPAC: ácido 2-metil-2-propenoico) indica un compuesto que tiene la fórmula a continuación, y también incluye cualquier sal o forma ionizada del mismo. Como sales de ácido metacrílico, por ejemplo, pueden ejemplificarse sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, sales de magnesio, etc.

30 CH₂=C(CH₃)COOH

Metacrilil-CoA

35 En la presente invención, la metacrilil-CoA es un compuesto expresado por la fórmula estructural a continuación. La metacrilil-CoA se conoce como producto intermedio metabólico de valina dentro de los organismos. La metacrilil-CoA usada en la presente invención se produce a partir de isobutiril-CoA o 3-hidroxiisobutiril-CoA. Como método de síntesis de metacrilil-CoA, se conocen el método de síntesis organoquímica de coenzima A con anhídrido metacrílico (Methods in Enzymology, 324, 73-79 (2000)) o un método de síntesis usando una reacción enzimática.

40 [Fórm. quím. 1]



45 En la presente invención, entre estos, pueden usarse favorablemente metacrilil-CoA (se remite a la figura 2) transformada mediante la acción de acil-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.99.3) (a continuación en el presente documento denominada ACD) con isobutiril-CoA como materia prima o metacrilil-CoA (se remite a la figura 1) transformada mediante la acción de enoil-CoA hidratasa (EC 4.2.1.17) (a continuación en el presente documento denominada ECH) a partir de 3-hidroxiisobutiril-CoA. En otras palabras, el método de la presente invención incluye 50 una etapa de producir metacrilil-CoA a partir de isobutiril-CoA o 3-hidroxiisobutiril-CoA. A partir de la reacción continua mediante la enzima, junto con estar relacionado con una mejora del rendimiento así como una supresión de la materia extraña, se hace posible la síntesis directa de éster del ácido metacrílico sin pasar a través de ácido metacrílico que tiene una alta toxicidad para los organismos, o la formación de subproductos. Según el método, es posible lograr la producción de éster del ácido metacrílico mediante una reacción continua *in vivo* (fermentación metabólica) con baja carga medioambiental.

Para la isobutiril-CoA usada en la presente invención, puede usarse una producida a partir de ácido 2-oxoisovalérico

(se remite a la figura 2). En otras palabras, el método de la presente invención puede incluir además una etapa de producir isobutiril-CoA a partir de ácido 2-oxoisovalérico.

Alcoholes y fenoles

Los alcoholes o fenoles que sirven como materias primas en la producción del éster del ácido metacrílico en la presente invención son compuestos expresados por la fórmula 2 a continuación. La estructura del alcohol o los fenoles corresponde a éster del ácido metacrílico; por tanto, la estructura de los mismos se define igual que R en la fórmula 1, y representa un grupo hidrocarbonado C1-20 lineal o ramificado. El grupo hidrocarbonado puede ser de tipo no cíclico saturado o insaturado, o puede ser de tipo cíclico saturado o insaturado. Es preferiblemente un alcohol, alcohol aralquílico o fenol no sustituido C1-10 lineal o ramificado, y de manera particularmente preferible un alcohol alquílico C1-8 tal como metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, sec-butanol, terc-butanol, alcohol n-pentílico, alcohol isopentílico, alcohol terc-pentílico, alcohol n-hexílico, alcohol isohexílico, alcohol 2-hexílico, alcohol dimetilbutílico, alcohol etilbutílico, alcohol heptílico, alcohol octílico, alcohol 2-etilhexílico; un alcohol bencílico o un fenol.

R-OH (Fórmula 2)

Alcohol aciltransferasa

La alcohol aciltransferasa de la presente invención (a continuación en el presente documento denominada AAT) es una enzima que tiene una acción catalítica para sintetizar éster provocando que el grupo acilo de acil-CoA se transfiera al alcohol o fenol. Se considera que la AAT participa en la formación de ésteres en diversas frutas. Se sabe que la AAT está presente en plantas tales como Zingiberales (plátano), Rosales (fresa, manzana, pera, melocotón), Cucurbitales (melón), Ericales (kiwi), Lamiales (aceituna), Solanales (tomate) y Sapindales (limón, mango).

La AAT usada en la presente invención no está particularmente limitada siempre que sea un catalizador de origen biológico que tiene una capacidad para producir éster del ácido metacrílico con metacrilil-CoA y alcohol o fenol como materias primas, y la clase y el origen de la misma no son de importancia. Una de origen vegetal es preferible como fuente de enzima, y entre ellas, es preferible una clasificada como una angiosperma.

La AAT adecuada para la presente invención puede seleccionarse fácilmente a partir de las plantas mediante el siguiente método. Se adquiere mediante corte una parte apropiada del tejido según sea necesario. Se añade una disolución que contiene metacrilil-CoA y un alcohol o fenol representado por la fórmula 2 a esta parte cortada, se agitan y se permite que reaccionen durante un tiempo determinado. Es posible confirmar la actividad de síntesis confirmando la presencia de éster del ácido metacrílico en esta disolución de reacción mediante CG (cromatografía de gases). Más específicamente, por ejemplo, se corta el sarcocarpio o pericarpio, se añade al mismo una disolución que contiene metacrilil-CoA de 1 a 10 mM, KCl 0,35 y de 5 a 50 veces la cantidad molar de n-butanol, y se agitan durante de 1 a 10 horas a 30 °C. Tras la finalización de la reacción, puede seleccionarse una AAT aplicable a la presente invención confirmando la presencia de éster del ácido metacrílico por medio de CG.

La fuente de enzima AAT adecuada para la presente invención, por ejemplo, es una que pertenece a cualquier orden seleccionado del grupo que consiste en Zingiberales, Rosales, Ericales, Cucurbitales, Brassicales, Laurales, Poales, Arecales, Asparagales, Saxifragales, Caryophyllales, Vitales, Malpighiales, Oxalidales, Fabales, Sapindales, Malvales, Myrtales, Ranunculales, Solanales, Lamiales, Gentianales y Asterales. Entre ellas, es preferiblemente una que pertenece a cualquier orden seleccionado del grupo que consiste en Zingiberales, Rosales, Ericales, Cucurbitales, Brassicales y Laurales.

Son preferibles plantas de Musaceae y Zingiberaceae como las que pertenecen al orden Zingiberales; son preferibles plantas de Rosaceae y Moraceae como las que pertenecen al orden Rosales; son preferibles plantas de Ericaceae, Actinidiaceae, Ebenaceae y Theaceae como las que pertenecen al orden Ericales; son preferibles plantas de Cucurbitaceae como las que pertenecen al orden Cucurbitales; son preferibles plantas de Caricaceae y Brassicaceae como las que pertenecen al orden Brassicales; son preferibles plantas de Lauraceae como las que pertenecen al orden Laurales; son preferibles plantas de Bromeliaceae y Poaceae como las que pertenecen al orden Poales; son preferibles plantas de Arecaceae como las que pertenecen al orden Arecales; son preferibles plantas de Orchidaceae e Iridaceae como las que pertenecen al orden Asparagales; son preferibles plantas de Grossulariaceae como las que pertenecen al orden Saxifragales; son preferibles plantas de Caryophyllaceae como las que pertenecen al orden Caryophyllales; son preferibles plantas de Vitaceae como las que pertenecen al orden Vitales; son preferibles plantas de Malpighiaceae, Passifloraceae, Euphorbiaceae y Salicaceae como las que pertenecen al orden Malpighiales; son preferibles plantas de Oxalidaceae como las que pertenecen al orden Oxalidales; son preferibles plantas de Fabaceae como las que pertenecen al orden Fabales; son preferibles plantas de Rutaceae, Sapindaceae y Anacardiaceae como las que pertenecen al orden Sapindales; son preferibles plantas de Malvaceae como las que pertenecen al orden Malvales; son preferibles plantas de Lythraceae, Onagraceae y Myrtaceae como las que pertenecen al orden Myrtales; son preferibles plantas de Ranunculaceae y Papaveraceae como las que pertenecen al orden Ranunculales; son preferibles plantas de Solanaceae como las que pertenecen al orden

Solanales; son preferibles plantas de Oleaceae, Verbenaceae y Lamiaceae como las que pertenecen al orden Lamiales; son preferibles plantas de Apocynaceae como las que pertenecen al orden Gentianales; y son preferibles plantas de Asteraceae como las que pertenecen al orden Asterales. También puede emplearse una especie relacionada de las plantas mencionadas anteriormente. Entre ellas, es más preferiblemente una planta que pertenece a Musacea, Rosaceae, Ericeae, Actinidiaceae, Cucurbitaceae, Caricaceae o Lauraceae.

Más específicamente, son preferibles plantas de *Musa* como las que pertenecen a la familia Musaceae; son preferibles plantas de *Zingiber* como las que pertenecen a la familia Zingiberaceae; son preferibles plantas de *Fragaria*, *Malus*, *Prunus*, *Pyrus*, *Eriobotrya*, *Chaenomeles*, *Rubus* y *Rosa* como las que pertenecen a la familia Rosaceae; son preferibles plantas de *Ficus* como las que pertenecen a la familia Moraceae; son preferibles plantas de *Vaccinium* como las que pertenecen a la familia Ericaceae; son preferibles plantas de *Actinidia* como las que pertenecen a la familia Actinidiaceae; son preferibles plantas de *Diospyros* como las que pertenecen a la familia Ebenaceae; son preferibles plantas de *Camellia* como las que pertenecen a la familia Theaceae; son preferibles plantas de *Cucumis* y *Citrullus* como las que pertenecen a la familia Cucurbitaceae; son preferibles plantas de *Carica* y *Vasconcellea* como las que pertenecen a la familia Caricaceae; son preferibles plantas de *Arabidopsis* como las que pertenecen a la familia Brassicaceae; son preferibles plantas de *Persea* como las que pertenecen a la familia Lauraceae; son preferibles plantas de *Ananas* como las que pertenecen a la familia Bromeliaceae; son preferibles plantas de *Oryza*, *Triticum*, *Hordeum*, *Zea*, *Sorghum* y *Brachipodium* como las que pertenecen a la familia Poaceae; son preferibles plantas de *Coccus* como las que pertenecen a la familia Arecaceae; son preferibles plantas de *Vanda* como las que pertenecen a la familia Orchidaceae; son preferibles plantas de *Iris* como las que pertenecen a la familia Iridaceae; son preferibles plantas de *Ribes* como las que pertenecen a la familia Grossulariaceae; son preferibles plantas de *Gypsophila* como las que pertenecen a la familia Caryophyllaceae; son preferibles plantas de *Vitis* como las que pertenecen a la familia Vitaceae; son preferibles plantas de *Malpighia* como las que pertenecen a la familia Malpighiaceae; son preferibles plantas de *Passiflora* como las que pertenecen a la familia Passifloraceae; son preferibles plantas de *Ricinus* como las que pertenecen a la familia Euphorbiaceae; son preferibles plantas de *Populus* como las que pertenecen a la familia Salicaceae; son preferibles plantas de *Averrhoa* como las que pertenecen a la familia Oxalidaceae; son preferibles plantas de *Medicago*, *Lupinus*, *Glicina* y *Clitoria* como las que pertenecen a la familia Fabaceae; son preferibles plantas de *Citrus* y *Aegle* como las que pertenecen a la familia Rutaceae; son preferibles plantas de *Litchi* como las que pertenecen a la familia Sapindaceae; son preferibles plantas de *Mangifera* como las que pertenecen a la familia Anacardiaceae; son preferibles plantas de *Durio* y *Theobroma* como las que pertenecen a la familia Malvaceae; son preferibles plantas de *Punica* como las que pertenecen a la familia Lythraceae; son preferibles plantas de *Clarkia* como las que pertenecen a la familia Onagraceae; son preferibles plantas de *Psidium* como las que pertenecen a la familia Myrtaceae; son preferibles plantas de *Actaea* como las que pertenecen a la familia Ranunculaceae; son preferibles plantas de *Papaver* como las que pertenecen a la familia Papaveraceae; son preferibles plantas de *Solanum*, *Capsicum*, *Nicotiana* y *Petunia* como las que pertenecen a la familia Solanaceae; son preferibles plantas de *Olea* como las que pertenecen a la familia Oleaceae; son preferibles plantas de *Glandularia* como las que pertenecen a la familia Verbenaceae; son preferibles plantas de *Salvia* como las que pertenecen a la familia Lamiaceae; son preferibles plantas de *Rauvolfia* y *Catharanthus* como las que pertenecen a la familia Apocynaceae; y son preferibles plantas de *Chamaemelum* como las que pertenecen a la familia Asteraceae. Entre ellas, son más preferibles plantas que pertenecen a *Musa*, *Fragaria*, *Malus*, *Prunus*, *Pyrus*, *Vaccinium*, *Actinidia*, *Cucumis*, *Carica* o *Persea*. Además, entre ellas, son particularmente preferibles plantas que pertenecen a *Musa*, *Malus*, *Pyrus*, *Actinidia*, *Cucumis*, *Carica* o *Persea*.

Además, más específicamente, son particularmente preferibles plantas de *Musa paradisiaca*, *Musa basjoo*, *Musa coccinea* y *Musa acuminata* como las que pertenecen al género *Musa*; son particularmente preferibles plantas de *Zingiber officinale* como las que pertenecen al género *Zingiber*; son particularmente preferibles plantas de *Fragaria xananassa*, *Fragaria virginiana*, *Fragaria chiloensis* y *Fragaria vesca* como las que pertenecen al género *Fragaria*; son particularmente preferibles plantas de *Malus pumila*, *Malus domestica*, *Malus baccata*, *Malus halliana*, *Malus floribunda* y *Malus prunifolia* como las que pertenecen al género *Malus*; son particularmente preferibles plantas de *Prunus mume*, *Prunus avium*, *Prunus persica*, *Prunus armeniaca*, *Prunus dulcis*, *Prunus salicina* y *Prunus domestica* como las que pertenecen al género *Prunus*; son particularmente preferibles plantas de *Pyrus communis*, *Pyrus pirifolia*, *Pyrus calleryana* y *Pyrus pyraster* como las que pertenecen al género *Pyrus*; son particularmente preferibles plantas de *Eriobotrya japonica* como las que pertenecen al género *Eriobotrya*; son particularmente preferibles plantas de *Chaenomeles sinensis* como las que pertenecen al género *Chaenomeles*; son particularmente preferibles plantas de *Rubus idaeus* y *Rubus fruticosus* como las que pertenecen al género *Rubus*; son particularmente preferibles plantas de *Rosa rugosa* como las que pertenecen al género *Rosa*; son particularmente preferibles plantas de *Ficus carica* como las que pertenecen al género *Ficus*; son particularmente preferibles plantas de *Vaccinium corymbosum*, *Vaccinium angustifolium*, *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium vitis-idaea* y *Vaccinium oxycoccus* como las que pertenecen al género *Vaccinium*; son particularmente preferibles plantas de *Actinidia chinensis*, *Actinidia deliciosa*, *Actinidia arguta*, *Actinidia rufa* y *Actinidia polygama* como las que pertenecen al género *Actinidia*; son particularmente preferibles plantas de *Diospyros kaki* como las que pertenecen al género *Diospyros*; son particularmente preferibles plantas de *Camellia sinensis* como las que pertenecen al género *Camellia*; son particularmente preferibles plantas de *Cucumis sativus*, *Cucumis melo*, *Cucumis anguria* y *Cucumis metulifer* como las que pertenecen al género *Cucumis*; son particularmente preferibles plantas de *Citrullus lanatus* como las que pertenecen al género *Citrullus*; son particularmente preferibles plantas de *Carica papaya* como las que pertenecen al género *Caricaceae*; son particularmente preferibles plantas de *Vasconcellea cundinamarcensis* como las que

pertenecen al género *Vasconcellea*; son particularmente preferibles plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Arabidopsis lyrata* como las que pertenecen al género *Arabidopsis*; son particularmente preferibles plantas de *Persea americana* como las que pertenecen al género *Persea*; son particularmente preferibles plantas de *Ananas comosus* como las que pertenecen al género *Ananas*; son particularmente preferibles plantas de *Oryza sativa* como las que pertenecen al género *Oryza*; son particularmente preferibles plantas de *Triticum aestivum* como las que pertenecen al género *Triticum*; son particularmente preferibles plantas de *Hordeum vulgare* como las que pertenecen al género *Hordeum*; son particularmente preferibles plantas de *Zea mays* como las que pertenecen al género *Zea*; son particularmente preferibles plantas de *Sorghum bicolor* como las que pertenecen al género *Sorghum*; son particularmente preferibles plantas de *Brachipodium distachyon* como las que pertenecen al género *Brachipodium*; son particularmente preferibles plantas de *Cocos nucifera* como las que pertenecen al género *Cocos*; son particularmente preferibles plantas de *Vanda hybridcultivar* como las que pertenecen al género *Vanda*; son particularmente preferibles plantas de *Iris hollandica* como las que pertenecen al género *Iris*; son particularmente preferibles plantas de *Ribes nigrum* como las que pertenecen al género *Ribes*; son particularmente preferibles plantas de *Gypsophila paniculata* y *Gypsophila elegans* como las que pertenecen al género *Gypsophila*; son particularmente preferibles plantas de *Vitis vinifera* y *Vitis labrusca* como las que pertenecen al género *Vitis*; son particularmente preferibles plantas de *Malpighia glabra* como las que pertenecen al género *Malpighia*; son particularmente preferibles plantas de *Passiflora edulis* como las que pertenecen al género *Passiflora*; son particularmente preferibles plantas de *Ricinus communis* como las que pertenecen al género *Ricinus*; son particularmente preferibles plantas de *Populus trichocarpa* como las que pertenecen al género *Populus*; son particularmente preferibles plantas de *Averrhoa carambola* como las que pertenecen al género *Averrhoa*; son particularmente preferibles plantas de *Medicago truncatula* como las que pertenecen al género *Medicago*; son particularmente preferibles plantas de *Lupinus albus* como las que pertenecen al género *Lupinus*; son particularmente preferibles plantas de *Glycine max* como las que pertenecen al género *Glycine*; son particularmente preferibles plantas de *Clitoria ternatea* como las que pertenecen al género *Clitoria*; son particularmente preferibles plantas de *Citrus limon*, *Citrus sudachi*, *Citrus sphaerocarpa*, *Citrus paradisi*, *Citrus junos*, *Citrus aurantium*, *Citrus unshiu* y *Citrus sinensis* como las que pertenecen al género *Citrus*; son particularmente preferibles plantas de *Aegle marmelos* como las que pertenecen al género *Aegle*; son particularmente preferibles plantas de *Litchi chinensis* como las que pertenecen al género *Litchi*; son particularmente preferibles plantas de *Mangifera indica* como las que pertenecen al género *Mangifera*; son particularmente preferibles plantas de *Durio zibetinus* como las que pertenecen al género *Durio*; son particularmente preferibles plantas de *Theobroma cacao* como las que pertenecen al género *Theobroma*; son particularmente preferibles plantas de *Punica granatum* como las que pertenecen al género *Punica*; son particularmente preferibles plantas de *Clarkia breweri* y *Clarkia concinna* como las que pertenecen al género *Clarkia*; son particularmente preferibles plantas de *Psidium guajava* como las que pertenecen al género *Psidium*; son particularmente preferibles plantas de *Actaea racemosa* como las que pertenecen al género *Actaea*; son particularmente preferibles plantas de *Papaver somniferum*, *Papaver orientale* y *Papaver bracteatum* como las que pertenecen al género *Papaver*; son particularmente preferibles plantas de *Solanum lycopersicum* como las que pertenecen al género *Solanum*; son particularmente preferibles plantas de *Capsicum annuum* y *Capsicum chinense* como las que pertenecen al género *Capsicum*; son particularmente preferibles plantas de *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana attenuata* como las que pertenecen al género *Nicotiana*; son particularmente preferibles plantas de *Petunia hybrida* como las que pertenecen al género *Petunia*; son particularmente preferibles plantas de *Olea europaea* como las que pertenecen al género *Olea*; son particularmente preferibles plantas de *Glandularia hybrida* como las que pertenecen al género *Glandularia*; son particularmente preferibles plantas de *Salvia splendens* como las que pertenecen al género *Salvia*; son particularmente preferibles plantas de *Rauvolfia serpentina* como las que pertenecen al género *Rauvolfia*; son particularmente preferibles plantas de *Catharanthus roseus* como las que pertenecen al género *Catharanthus*; y son particularmente preferibles plantas de *Chamaemelum nobile* como las que pertenecen al género *Chamaemelum*. Entre ellas, es más preferible plátano, fresa, manzana, albaricoque japonés, pera europea, arándano, kiwi, melón, papaya o aguacate. Además, entre ellas, es particularmente preferible plátano, manzana, pera europea, kiwi, melón, papaya o aguacate.

Debe indicarse que, en el caso de realizar la reacción de síntesis usando una planta tal cual como fuente de enzima, en particular, es más preferible usar plantas que pertenecen a *Malus*, *Carica* y *Persea*, cuando se define un alcohol C1-2 como sustrato. Esto se debe a que tienen una eficacia de generación superior a plantas que pertenecen a otro género.

En la presente invención, las clasificaciones de plantas se definen siguiendo el Botanical Journal de la Linnean Society, 2009, 161, 105121.

En la presente invención, tras suministrar AAT para la reacción, el modo de uso no está particularmente limitado siempre que presente la actividad catalítica mencionada anteriormente, y es posible usar el tejido biológico o producto procesado del mismo tal cual. Como tal tejido biológico, puede usarse toda la planta, órganos de la planta (por ejemplo, fruto, hojas, pétalos, tallo, semilla, etc.), o tejido de la planta (por ejemplo, piel del fruto, sarcocarpio, etc.). Como producto procesado de la misma, puede ejemplificarse el líquido enzimático en bruto de la extracción de AAT a partir de estos tejidos biológicos, enzima purificada, o similares.

Microorganismo recombinante de expresión de actividad de AAT

Además, tras suministrar AAT para la reacción, el gen para la AAT se aísla, por ejemplo, se introduce en un sistema

de huésped-vector general, y puede usarse el microorganismo transformado mediante este sistema de vector. Como huésped, con respecto a bacterias, pueden ejemplificarse *E. coli*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, etc.; con respecto a levaduras, pueden ejemplificarse *Saccharomyces*, *Candida*, *Shizosaccharomyces* y *Pichia*; y con respecto a hongos filamentosos, pueden ejemplificarse *Aspergillus*, etc. Entre estos, es particularmente fácil usar bacterias, y también es preferible en eficacia.

Se han publicado varios genes de AAT (por ejemplo, se remite al documento de patente 7). Se prepara una sonda de ADN basándose en esta publicación, y por ejemplo, se prepara un cebador usado en PCR, y este gen puede aislar realizando PCR. Además, también es posible sintetizar completamente la secuencia de nucleótidos del gen de AAT mediante un método común. Puede confirmarse de manera similar mediante el método si estas AAT para las que se conoce la información genética tienen actividad de síntesis para éster del ácido metacrílico. Por otro lado, para AAT que tienen información genética que no está clara, puede purificarse la AAT, y puede obtenerse información genética mediante un método de ingeniería genética basándose en las proteínas de la misma.

Como gen de AAT preferido para su uso en el método de la presente invención, no está particularmente limitado siempre que el producto traducido del mismo tenga la capacidad de producir éster del ácido metacrílico, y se selecciona apropiadamente de entre las fuentes de enzima AAT. De manera particularmente preferible, pueden ejemplificarse el gen de AAT derivado de manzana (SEQ ID NO: 2), gen de AAT derivado de fresa (SEQ ID NO: 4) y gen de AAT derivado de fresa (SEQ ID NO: 6).

Debe indicarse que los genes que codifican proteínas que tienen actividad para producir éster del ácido metacrílico a partir de metacrilil-CoA y alcohol que incluyen una secuencia de aminoácidos en la que uno o una pluralidad de aminoácidos se han sustituido, delecionado o añadido a una secuencia de aminoácidos de tipo natural también se incluyen en los genes de AAT para su uso en el método de la presente invención.

En el presente documento, el término "pluralidad" se refiere a de 1 a 40, preferiblemente de 1 a 20, y más preferiblemente no más de 10. Con el fin de introducir mutación en el gen, es posible usar un kit para la introducción de mutaciones usando un método de mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange™ (Stratagene), el sistema de mutagénesis dirigida al sitio GeneTailor™ (Invitrogen), el sistema de mutagénesis dirigida al sitio TaKaRa (Mutan-K, Mutan-Super Express Km, etc.: Takara Bio), etc., mediante un método conocido tal como el método Kunkel o el método Gapped duplex. Alternativamente, todo el gen que tiene una secuencia que incluye mutación puede sintetizarse artificialmente.

En el presente método, la confirmación de la secuencia de nucleótidos de ADN puede realizarse mediante determinación de la secuencia mediante un método común. Por ejemplo, basándose en el método de Sanger, es posible confirmar la secuencia usando un secuenciador de ADN apropiado.

Además, en el gen de AAT para su uso en el método de la presente invención, también se incluyen genes que codifican proteínas que tienen actividad para producir éster del ácido metacrílico a partir de metacrilil-CoA y alcohol que expresan una identidad de al menos el 90 % con la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de tipo natural, preferiblemente el 95 %, más preferiblemente el 99,5 % e incluso más preferiblemente el 99,9 %.

Además, en el gen de AAT para su uso en el método de la presente invención, también se incluyen genes que se hibridan en condiciones rigurosas con un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de tipo natural, y que codifican una proteína que tiene actividad para producir éster del ácido metacrílico a partir de metacrilil-CoA y alcohol. Como condiciones rigurosas, por ejemplo, es posible ejemplificar condiciones de realizar la hibridación manteniendo una membrana de nailon que fija el ADN a la misma temperatura mientras se estudia con sonda a 65 °C durante 20 horas en una disolución que contiene 6 × SSC (1 × SSC se prepara disolviendo 8,76 g de cloruro de sodio y 4,41 g de citrato de sodio en 1 litro de agua), SDS al 1 %, ADN de esperma de salmón 100 µg/ml, albúmina sérica bovina al 0,1 %, polivinilpirrolidona al 0,1 % y ficoll al 0,1 %. Para un experto en la técnica, es posible tener en cuenta otros términos y condiciones tales como concentración de sonda, longitud de sonda y tiempo de reacción además de condiciones tales como concentración de sal, temperatura del tampón, etc. para establecer las condiciones de hibridación. Como condiciones de secado tras la hibridación, por ejemplo, pueden ejemplificarse "2 × SSC, SDS al 0,1 %, 42 °C" y "1 × SSC, SDS al 0,1 %, 37 °C", y como condiciones más rigurosas, por ejemplo, condiciones tales como "1 × SSC, SDS al 0,1 %, 65 °C" y "0,5 × SSC, SDS al 0,1 %, 50 °C".

Con respecto a la secuencia detallada del método de hibridación, es posible referirse a Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2.ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons (1987-1997)), o similares.

Además, en el gen de AAT para su uso en el método de la presente invención, cuando se calcula usando la secuencia de nucleótidos de tipo natural, BLAST, etc. (por ejemplo, parámetros por defecto, es decir configuración inicial, parámetros), también se incluyen genes que codifican proteína que tiene actividad para producir éster del ácido metacrílico a partir de metacrilil-CoA y alcohol que consisten en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 90 % y más preferiblemente al menos el 95 %.

Además, los codones de los genes de AAT mencionados anteriormente pueden cambiarse según la frecuencia de uso de codones en el microorganismo huésped usado en la transformación genética.

- En el presente documento, a "identidad" de la secuencia, cuando es el caso de una secuencia de nucleótidos, se llega alineando ambas secuencias de nucleótidos de modo que las bases de las dos secuencias de nucleótidos que van a compararse coincidan tanto como sea posible, y luego expresando un valor al que se llega restando el número de bases coincidentes del número total de bases como un porcentaje. Tras la alineación mencionada anteriormente, se insertan huecos apropiados en una o ambas de las dos secuencias comparadas según sea necesario. Una alineación de secuencias de este tipo puede realizarse usando un programa conocido tal como BLAST, FASTA y CLUSTAL, por ejemplo. En el caso de que estén insertándose huecos, el número total de bases mencionado anteriormente se convierte en el número de bases al que se llega contando un hueco como una base. En el caso de que el número total de bases al que se llega contando de ese modo difiera entre las dos secuencias comparadas, la identidad (%) se calcula restando el número de bases coincidentes del número total de bases en la secuencia más larga. Esto se aplica de manera similar también para la identidad de secuencias de aminoácidos.
- En la reacción de síntesis del éster del ácido metacrílico, es posible usar el caldo obtenido cultivando estos microorganismos recombinantes tal cual, o usar la célula bacteriana obtenida mediante una operación de cosecha tal como centrifugación de este caldo, un producto procesado del mismo, o similar. Como producto procesado de células bacterianas, pueden ejemplificarse una célula bacteriana tratada con acetona, tolueno o similar, células bacterianas secadas por congelación, células bacterianas rotas o extracto no celular a partir de células bacterianas rotas, enzima en bruto extraída de estas enzimas o enzima purificada, etc.
- El éster del ácido metacrílico también puede sintetizarse con isobutiril-CoA o 3-hidroxiisobutiril-CoA como materia prima introduciendo simultáneamente gen de ACD o gen de ECH con gen de AAT (se remite a la figura 1 y la figura 2). Además, combinando e introduciendo gen de ácido 2-oxoisovalérico deshidrogenasa (a continuación en el presente documento denominada BCKAD), también es posible sintetizar ácido metacrílico a partir de ácido 2-oxoisovalérico.
- Aunque no hay ninguna limitación particular en los orígenes de ACD, ECH y BCKAD, pueden ejemplificarse los microorganismos enumerados a continuación.
- Es un microorganismo que pertenece al género *Magnetospirillum*, *Rhodospirillum*, *Azospirillum*, *Tistrella*, *Acidiphilium*, *Rhodobacter*, *Paracoccus*, *Ruegeria*, *Jannaschia*, *Roseobacter*, *Dinoroseobacter*, *Pseudovibrio*, *Phaeobacter*, *Octadecabacter*, *Hyphomonas*, *Maricaulis*, *Hirschia*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Sphingopyxis*, *Sphingobium*, *Erythrobacter*, *Brevundimonas*, *Caulobacter*, *Phenylobacterium*, *Asticcacaulis*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Xanthobacter*, *Azorhizobium*, *Brucella*, *Ochrobactrum*, *Mesorhizobium*, *Chelativorans*, *Aurantimonas*, *Bradyrhizobium*, *Agromonas*, *Rhodopseudomonas*, *Nitrobacter*, *Methylobacterium*, *Rhodomicrobium*, *Pelagibacterium*, *Parvibaculum*, *Methylocystis*, *Parvularcula*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Polynucleobacter*, *Achromobacter*, *Bordetella*, *Taylorella*, *Pusillimonas*, *Comamonas*, *Alicyclophilus*, *Delftia*, *Ramlibacter*, *Rhodoferax*, *Variovorax*, *Polaromonas*, *Acidovorax*, *Verminephrobacter*, *Herminimonas*, *Herbaspirillum*, *Collimonas*, *Chromobacterium*, *Laribacter*, *Pseudogulbenkiania*, *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Aromatoleum*, *Azoarcus*, *Dechloromonas*, *Thauera*, *Azospira* (*Dechlorosoma*), *Rheinheimera*, *Nitrosococcus*, *Halorhodospira*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Rhodanobacter*, *Francisella*, *Cycloclasticus*, *Oceanospirillum*, *Hahella*, *Halomonas*, *Alcanivorax*, *Kangienda*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Alisewanella*, *Alteromonas*, *Glaciecola*, *Marinobacter*, *Marinobacterium*, *Saccharophagus*, *Shewanella*, *Ferrimonas*, *Idiomarina*, *Colwellia*, *Pseudoalteromonas*, *Listonella*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, *Oceanimonas*, *Salinispaea*, *Legionella*, *Coxiella*, *Desulfococcus*, *Desulfobacterium*, *Desulfatibacillum*, *Desulfobulbus*, *Desulfarculus*, *Geobacter*, *Syntrophobacter*, *Syntrophus*, *Desulfomonile*, *Bdellovibrio*, *Bacteriovorax*, *Stigmatella*, *Myxococcus*, *Anaeromyxobacter*, *Sorangium*, *Haliangium*, *Acidobacterium*, *Granulicella*, *Illumatobacter*, *Streptosporangium*, *Nocardiopsis*, *Thermobifida*, *Thermomonospora*, *Pseudonocardia*, *Amycolatopsis*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Thermobispora*, *Actinosynnema*, *Micromonospora*, *Salinispora*, *Verrucosipora*, *Nocardioides*, *Kribbella*, *Corynebacterium*, *Nocardioides*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia*, *Mycobacterium*, *Amycolicicoccus*, *Tsukamurella*, *Segniliparus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Citricoccus*, *Renibacterium*, *Kocuria*, *Kytococcus*, *Cellulomonas*, *Intrasporangium*, *Serinicoccus*, *Frankia*, *Acidothermus*, *Nakamurella*, *Geodermatophilus*, *Stackebrandtia*, *Streptomyces*, *Catenulipspora*, *Rubrobacter*, *Conexibacter*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Oceanobacillus*, *Lysinibacillus*, *Halobacillus*, *Alicyclobacillus*, *Kypridia*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Clostridium*, *Alkaliphilus*, *Syntrophomonas*, *Syntrophothermus*, *Eubacterium*, *Desulfotomaculum*, *Pelotomaculum*, *Butyrivibrio*, *Roseburia*, *Oscillibacter*, *Thermoanaerobacter*, *Carboxydotothermus*, *Natranaerobius*, *Sphingobacterium*, *Pedobacter*, *Haliscomenobacter*, *Porphyromonas*, *Odoribacter*, *Spirosoma*, *Runella*, *Maribacter*, *Deinococcus*, *Thermus*, *Meiothermus*, *Oceanithermus*, *Marinithermus*, *Gemmamonas*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Roseiflexus*, *Herpetosiphon*, *Thermomicrobium*, *Thermotoga*, *Thermosiphon*, *Fervidobacterium*, *Deferribacter*, *Calditerrivibrio*, *Flexistipes*, *Metallosphaera*, *Aeropyrum*, *Pyrobaculum*, *Caldivirga*, *Vulcanisaeta*, *Acidilobus*, *Haloarcula*, *Haloquadratum*, *Natronomonas*, *Halorubrum*, *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Halalkalicoccus*, *Halogeometricum*, *Thermoplasma*, *Picrophilus*, *Ferroplasma*, *Archaeoglobus*, *Ferroglobus*, *Polymorphum*, *Micavibrio*, *Simiduia*, *Leptothrix*, *Thiomonas*, *Rubrivivax*, *Methylibium*, *Exiguobacterium* y *Anaerococcus*.

Además, *Magnetospirillum magneticum* es particularmente preferible como el microorganismo clasificado como *Magnetospirillum*; son particularmente preferibles *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospirillum centenum* y *Rhodospirillum photometricum* como el microorganismo clasificado como *Rhodospirillum*; son particularmente preferibles *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense* como el microorganismo clasificado como *Azospirillum*; es particularmente preferible *Tistrella mobilis* como el microorganismo clasificado como *Tistrella*; son particularmente preferibles *Acidiphilium cryptum* y *Acidiphilium multivorum* como el microorganismo clasificado como *Acidiphilium*; son particularmente preferibles *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodobacter capsulatus* como el microorganismo clasificado como *Rhodobacter*; son particularmente preferibles *Paracoccus denitrificans* y *Paracoccus aminophilus* como el microorganismo clasificado como *Paracoccus*; es particularmente preferible *Ruegeria pomeroyi* como el microorganismo clasificado como *Ruegeria*; son particularmente preferibles *Roseobacter denitrificans* y *Roseobacter litoralis* como el microorganismo clasificado como *Roseobacter*; es particularmente preferible *Dinoroseobacter shibae* como el microorganismo clasificado como *Dinoroseobacter*; es particularmente preferible *Phaeobacter gallaeciensis* como el microorganismo clasificado como *Phaeobacter*; son particularmente preferibles *Octadecabacter antarcticus* y *Octadecabacter arcticus* como el microorganismo clasificado como *Octadecabacter*; es particularmente preferible *Hiphomonas neptunium* como el microorganismo clasificado como *Hiphomonas*; es particularmente preferible *Maricaulis maris* como el microorganismo clasificado como *Maricaulis*; es particularmente preferible *Hirschia baltica* como el microorganismo clasificado como *Hirschia*; son particularmente preferibles *Sphingomonas paucimobilis* y *Sphingomonas wittichii* como el microorganismo clasificado como *Sphingomonas*; es particularmente preferible *Novosphingobium aromaticivorans* como el microorganismo clasificado como *Novosphingobium*; es particularmente preferible *Sphingopyxis alaskensis* como el microorganismo clasificado como *Sphingopyxis*; son particularmente preferibles *Sphingobium japonicum* y *Sphingobium chlorofenolicum* como el microorganismo clasificado como *Sphingobium*; es particularmente preferible *Erythrobacter litoralis* como el microorganismo clasificado como *Erythrobacter*; son particularmente preferibles *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas subvibrioides* y *Brevundimonas vesicularis* como el microorganismo clasificado como *Brevundimonas*; son particularmente preferibles *Caulobacter crescentus* y *Caulobacter segnis* como el microorganismo clasificado como *Caulobacter*; es particularmente preferible *Phenylobacterium zucineum* como el microorganismo clasificado como *Phenylobacterium*; es particularmente preferible *Asticcacaulis excentricus* como el microorganismo clasificado como *Asticcacaulis*; son particularmente preferibles *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter* y *Agrobacterium luteum* como el microorganismo clasificado como *Agrobacterium*; son particularmente preferibles *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium etli* y *Rhizobium tropici* como el microorganismo clasificado como *Rhizobium*; son particularmente preferibles *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium medicae* y *Sinorhizobium fredii* como el microorganismo clasificado como *Sinorhizobium*; son particularmente preferibles *Xanthobacter agilis*, *Xanthobacter aminoxidans*, *Xanthobacter autotrophicus*, *Xanthobacter flavus*, *Xanthobacter tagetidis* y *Xanthobacter viscosus* como el microorganismo clasificado como *Xanthobacter*; es particularmente preferible *Azorhizobium caulinodans* como el microorganismo clasificado como *Azorhizobium*; son particularmente preferibles *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis*, *Brucella microti*, *Brucella pinnipedialis* y *Brucella ceti* como el microorganismo clasificado como *Brucella*; son particularmente preferibles *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum cytisi*, *Ochrobactrum daejeonense*, *Ochrobactrum gallinaceum*, *Ochrobactrum grignonense*, *Ochrobactrum haemophilum*, *Ochrobactrum intermedium*, *Ochrobactrum lupini*, *Ochrobactrum oryzae*, *Ochrobactrum pseudointermedium*, *Ochrobactrum pseudogrignonense*, *Ochrobactrum tiofenivorans* y *Ochrobactrum tritici* como el microorganismo clasificado como *Ochrobactrum*; son particularmente preferibles *Mesorhizobium alhagi*, *Mesorhizobium albiziae*, *Mesorhizobium amorphae*, *Mesorhizobium australicum*, *Mesorhizobium caraganae*, *Mesorhizobium chacoense*, *Mesorhizobium ciceri*, *Mesorhizobium gobiense*, *Mesorhizobium loti*, *Mesorhizobium mediterraneum*, *Mesorhizobium metallidurans*, *Mesorhizobium opportunistum*, *Mesorhizobium plurifarium*, *Mesorhizobium huakuii*, *Mesorhizobium septentrionale*, *Mesorhizobium shangricense*, *Mesorhizobium tarimense*, *Mesorhizobium temperatum*, *Mesorhizobium tioganganeticum* y *Mesorhizobium tianshanense* como el microorganismo clasificado como *Mesorhizobium*; es particularmente preferible *Aurantimonas manganoxidans* como el microorganismo clasificado como *Aurantimonas*; es particularmente preferible *Bradyrhizobium japonicum* como el microorganismo clasificado como *Bradyrhizobium*; es particularmente preferible *Agromonas oligotrophica* como el microorganismo clasificado como *Agromonas*; es particularmente preferible *Rhodopseudomonas palustris* como el microorganismo clasificado como *Rhodopseudomonas*; son particularmente preferibles *Nitrobacter winogradskyi* y *Nitrobacter hamburgensis* como el microorganismo clasificado como *Nitrobacter*; son particularmente preferibles *Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium radiotolerans* y *Methylobacterium nodulans* como el microorganismo clasificado como *Methylobacterium*; es particularmente preferible *Rhodomicrobium vannielii* como el microorganismo clasificado como *Rhodomicrobium*; es particularmente preferible *Pelagibacterium halotolerans* como el microorganismo clasificado como *Pelagibacterium*; es particularmente preferible *Parvibaculum lavamentivorans* como el microorganismo clasificado como *Parvibaculum*; es particularmente preferible *Parvularcula bermudensis* como el microorganismo clasificado como *Parvularcula*; son particularmente preferibles *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, *Burkholderia vietnamensis*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia xenovorans*, *Burkholderia phymatum*, *Burkholderia phytofirmans*, *Burkholderia glumae*, *Burkholderia rhizoxinica*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia fenoliruptrix* y *Burkholderia oklahomensis* como el microorganismo clasificado como *Burkholderia*; son particularmente preferibles *Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia pickettii* y *Ralstonia eutropha* como el microorganismo clasificado como *Ralstonia*; son particularmente preferibles *Cupriavidus metallidurans*, *Cupriavidus taiwanensis* y *Cupriavidus necator* como el microorganismo clasificado como *Cupriavidus*; es particularmente preferible *Polynucleobacter necessarius* como el microorganismo clasificado como *Polynucleobacter*; son particularmente

preferibles *Achromobacter arsenitoxydans*, *Achromobacter cholinophagum*, *Achromobacter cycloclastes*, *Achromobacter denitrificans*, *Achromobacter fischeri*, *Achromobacter hartlebii*, *Achromobacter immobilis*, *Achromobacter insolitus*, *Achromobacter lactolyticus*, *Achromobacter lyticus*, *Achromobacter methanoliphila*, *Achromobacter pestifer*, *Achromobacter piechaudii*, *Achromobacter ruhlandii*, *Achromobacter spanios*, *Achromobacter viscosus*, *Achromobacter xerosis* y *Achromobacter xilosoxidans* como el microorganismo clasificado como *Achromobacter*; son particularmente preferibles *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella petrii* y *Bordetella avium* como el microorganismo clasificado como *Bordetella*; es particularmente preferible *Taylorella equigenitalis* como el microorganismo clasificado como *Taylorella*; son particularmente preferibles *Comamonas acidovorans*, *Comamonas aquatica*, *Comamonas badia*, *Comamonas composti*, *Comamonas denitrificans*, *Comamonas granuli*, *Comamonas kerstersii*, *Comamonas koreensis*, *Comamonas nitrativorans*, *Comamonas odontotermites*, *Comamonas terrae*, *Comamonas terrigena*, *Comamonas testosteroni*, *Comamonas tiooxidans* y *Comamonas zonglianii* como el microorganismo clasificado como *Comamonas*; es particularmente preferible *Alicycliphilus denitrificans* como el microorganismo clasificado como *Alicycliphilus*; es particularmente preferible *Delftia acidovorans* como el microorganismo clasificado como *Delftia*; es particularmente preferible *Ramlibacter tataouinensis* como el microorganismo clasificado como *Ramlibacter*; es particularmente preferible *Rhodoferax ferrireducens* como el microorganismo clasificado como *Rhodoferax*; es particularmente preferible *Variovorax paradoxus* como el microorganismo clasificado como *Variovorax*; es particularmente preferible *Polaromonas naphthalenivorans* como el microorganismo clasificado como *Polaromonas*; son particularmente preferibles *Acidovorax citrulli*, *Acidovorax ebreus* y *Acidovorax avenae* como el microorganismo clasificado como *Acidovorax*; es particularmente preferible *Verminephrobacter eiseniae* como el microorganismo clasificado como *Verminephrobacter*; es particularmente preferible *Herminiimonas arsenicoxidans* como el microorganismo clasificado como *Herminiimonas*; es particularmente preferible *Herbaspirillum seropedicae* como el microorganismo clasificado como *Herbaspirillum*; es particularmente preferible *Collimonas fungivorans* como el microorganismo clasificado como *Collimonas*; es particularmente preferible *Chromobacterium violaceum* como el microorganismo clasificado como *Chromobacterium*; es particularmente preferible *Laribacter hongkongensis* como el microorganismo clasificado como *Laribacter*; es particularmente preferible *Pseudogulbenkiania ferrooxidans* como el microorganismo clasificado como *Pseudogulbenkiania*; es particularmente preferible *Nitrosomonas europaea* como el microorganismo clasificado como *Nitrosomonas*; es particularmente preferible *Nitrosospira multiformis* como el microorganismo clasificado como *Nitrosospira*; es particularmente preferible *Aromatoleum aromaticum* como el microorganismo clasificado como *Aromatoleum*; es particularmente preferible *Decloramonas aromatica* como el microorganismo clasificado como *Decloramonas*; es particularmente preferible *Azospira oryzae* (*Declorosoma suillum*) como el microorganismo clasificado como *Azospira* (*Declorosoma*); es particularmente preferible *Rheinheimera nanhaiensis* como el microorganismo clasificado como *Rheinheimera*; es particularmente preferible *Nitrosococcus oceanii* como el microorganismo clasificado como *Nitrosococcus*; es particularmente preferible *Halorhodospira halophila* como el microorganismo clasificado como *Halorhodospira*; son particularmente preferibles *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas oryzae*, *Xanthomonas albilineans* y *Xanthomonas citri* como el microorganismo clasificado como *Xanthomonas*; es particularmente preferible *Stenotrophomonas maltophilia* como el microorganismo clasificado como *Stenotrophomonas*; son particularmente preferibles *Pseudoxanthomonas suwonensis* y *Pseudoxanthomonas spadix* como el microorganismo clasificado como *Pseudoxanthomonas*; son particularmente preferibles *Francisella tularensis* y *Francisella novicida* como el microorganismo clasificado como *Francisella*; es particularmente preferible *Cycloclasticus zangles* como el microorganismo clasificado como *Cycloclasticus*; es particularmente preferible *Hahella chejuensis* como el microorganismo clasificado como *Hahella*; es particularmente preferible *Halomonas elongata* como el microorganismo clasificado como *Halomonas*; son particularmente preferibles *Alcanivorax borkumensis* y *Alcanivorax dieselolei* como el microorganismo clasificado como *Alcanivorax*; es particularmente preferible *Kangiella koreensis* como el microorganismo clasificado como *Kangiella*; son particularmente preferibles *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas agarici*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas amygdale* y *Pseudomonas stutzeri*, por ejemplo, como el microorganismo clasificado como *Pseudomonas*; es particularmente preferible *Azotobacter vinelandii* como el microorganismo clasificado como *Azotobacter*; son particularmente preferibles *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter ailyi*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter gyllenbergii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter oleivorans* y *Acinetobacter parvus* como el microorganismo clasificado como *Acinetobacter*; son particularmente preferibles *Psychrobacter arcticus* y *Psychrobacter cryohalolentis* como el microorganismo clasificado como *Psychrobacter*; es particularmente preferible *Alisewanella jeotgali* como el microorganismo clasificado como *Alisewanella*; es particularmente preferible *Alteromonas macleodii* como el microorganismo clasificado como *Alteromonas*; son particularmente preferibles *Glaciecola nitratireducens*, *Glaciecola psychrophila* y *Glaciecola punicea* como el microorganismo clasificado como *Glaciecola*; son particularmente preferibles *Marinobacter aquaeolei*, *Marinobacter hidrocarbonoclasticus*, *Marinobacter adhaerens*, *Marinobacter algicola* y *Marinobacter manganoxidans* como el microorganismo clasificado como *Marinobacter*; es particularmente preferible *Marinobacterium stanieri* como el microorganismo clasificado como *Marinobacterium*; es particularmente preferible *Saccharophagus degradans* como el microorganismo clasificado como *Saccharophagus*; son particularmente preferibles *Shewanella piezotolerans*, *Shewanella abyssi*, *Shewanella affinis*, *Shewanella algae*, *Shewanella algidipiscicola*, *Shewanella amazonensis*, *Shewanella aquimarina*, *Shewanella arctica*, *Shewanella atlantica*, *Shewanella baltica*, *Shewanella basaltis*, *Shewanella benthica*, *Shewanella candalensis*, *Shewanella chilensis*, *Shewanella colwelliana*, *Shewanella corallii*, *Shewanella decoloracionis*, *Shewanella denitrificans*, *Shewanella donghaensis*, *Shewanella fidelis*, *Shewanella fodinae*, *Shewanella frigidimarina*, *Shewanella gaetbuli*, *Shewanella gelidimarina*, *Shewanella glacialipiscicola*, *Shewanella gopherii*, *Shewanella*

5 *Shewanella hafniensis*, *Shewanella halifaxensis*, *Shewanella haliotis*, *Shewanella hanedai*, *Shewanella japonica*,
Shewanella kaireitica, *Shewanella ivingstonensis*, *Shewanella loihica*, *Shewanella marina*, *Shewanella marinintestina*,
Shewanella marisflavi, *Shewanella morhuae*, *Shewanella olleyana*, *Shewanella oneidensis*,
Shewanella pacifica, *Shewanella pealeana*, *Shewanella pneumatophori*, *Shewanella profunda*, *Shewanella putrefaciens*,
Shewanella sairae, *Shewanella schlegeliana*, *Shewanella sediminis*, *Shewanella surugensis*,
Shewanella vesiculosa, *Shewanella violacea*, *Shewanella waksmanii*, *Shewanella woodyi* y *Shewanella xiamensis*
 como el microorganismo clasificado como *Shewanella*; es particularmente preferible *Ferrimonas balearica* como el
 10 microorganismo clasificado como *Ferrimonas*; son particularmente preferibles *Idiomarina loihensis* e *Idiomarina baltica* como el microorganismo clasificado como *Idiomarina*; es particularmente preferible *Colwellia psychrerythraea* como el microorganismo clasificado como *Colwellia*; son particularmente preferibles *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Pseudoalteromonas atlantica* y *Pseudoalteromonas tunicata* como el microorganismo clasificado como
 15 *Pseudoalteromonas*; son particularmente preferibles *Listonella anguillara*, *Listonella anguillarum* y *Listonella pelagia* como el microorganismo clasificado como *Listonella*; son particularmente preferibles *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio tubiashii*, *Vibrio sinaloensis*, *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio orientalis*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio coralliilyticus*, *Vibrio caribbenthicus*, *Vibrio brasiliensis* y *Vibrio alginolyticus* como el microorganismo
 20 clasificado como *Vibrio*; es particularmente preferible *Photobacterium profundum* como el microorganismo clasificado como *Photobacterium*; son particularmente preferibles *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas veronii* como el microorganismo clasificado como *Aeromonas*; es particularmente preferible *Salinisphaera shabanensis* como el microorganismo clasificado como *Salinisphaera*; son particularmente preferibles *Legionella pneumophila* y *Legionella longbeachae* como el microorganismo clasificado como *Legionella*; es particularmente preferible *Coxiella burnetii* como el microorganismo clasificado como *Coxiella*; es particularmente preferible *Desulfococcus oleovorans* como el microorganismo clasificado como *Desulfococcus*; es particularmente preferible *Desulfobacterium autotrophicum* como el microorganismo clasificado como *Desulfobacterium*; es particularmente preferible *Desulfatibacillum alkenivorans* como el microorganismo clasificado como *Desulfatibacillum*; es
 25 particularmente preferible *Desulfobulbus propionicus* como el microorganismo clasificado como *Desulfobulbus*; es particularmente preferible *Desulfarculus baarsii* como el microorganismo clasificado como *Desulfarculus*; son particularmente preferibles *Geobacter metallireducens*, *Geobacter uraniireducens* y *Geobacter bemandjiensis* como el microorganismo clasificado como *Geobacter*; es particularmente preferible *Syntrophobacter fumaroxidans* como el microorganismo clasificado como *Syntrophobacter*; es particularmente preferible *Syntrophus aciditrophicus* como el
 30 microorganismo clasificado como *Syntrophus*; es particularmente preferible *Desulfomonile tiedjei* como el microorganismo clasificado como *Desulfomonile*; son particularmente preferibles *Bdellovibrio bacteriovorus* y *Bdellovibrio exovorus* como el microorganismo clasificado como *Bdellovibrio*; es particularmente preferible *Bacteriovorax marinus* como el microorganismo clasificado como *Bacteriovorax*; es particularmente preferible *Stigmatella aurantiaca* como el microorganismo clasificado como *Stigmatella*; son particularmente preferibles
 35 *Myxococcus xanthus* y *Myxococcus fulvus* como el microorganismo clasificado como *Myxococcus*; es particularmente preferible *Anaeromyxobacter dehalogenoans* como el microorganismo clasificado como *Anaeromyxobacter*; es particularmente preferible *Sorangium cellulosum* como el microorganismo clasificado como *Sorangium*; es particularmente preferible *Haliangium ochraceum* como el microorganismo clasificado como *Haliangium*; es particularmente preferible *Acidobacterium capsulatum* como el microorganismo clasificado como
 40 *Acidobacterium*; es particularmente preferible *Granulicella tundricola* como el microorganismo clasificado como *Granulicella*; es particularmente preferible *Ilumatobacter coccineum* como el microorganismo clasificado como *Ilumatobacter*; es particularmente preferible *Streptosporangium roseum* como el microorganismo clasificado como *Streptosporangium*; es particularmente preferible *Nocardiopsis dassonvillei* como el microorganismo clasificado como *Nocardiopsis*; es particularmente preferible *Thermobifida fusca* como el microorganismo clasificado como
 45 *Thermobifida*; es particularmente preferible *Thermomonospora curvata* como el microorganismo clasificado como *Thermomonospora*; es particularmente preferible *Pseudonocardia dioxanivorans* como el microorganismo clasificado como *Pseudonocardia*; es particularmente preferible *Amycolatopsis mediterranei* como el microorganismo clasificado como *Amycolatopsis*; son particularmente preferibles *Saccharomonospora viridis* y *Saccharomonospora xinjiangensis* como el microorganismo clasificado como *Saccharomonospora*; son particularmente preferibles
 50 *Saccharopolyspora erythraea* y *Saccharopolyspora spinosa* como el microorganismo clasificado como *Saccharopolyspora*; es particularmente preferible *Thermobispora bispora* como el microorganismo clasificado como *Thermobispora*; es particularmente preferible *Actinosynnema mirum* como el microorganismo clasificado como *Actinosynnema*; es particularmente preferible *Micromonospora aurantiaca* como el microorganismo clasificado como *Micromonospora*; son particularmente preferibles *Salinispora tropica* y *Salinispora arenicola* como el microorganismo
 55 clasificado como *Salinispora*; es particularmente preferible *Verrucosispora maris* como el microorganismo clasificado como *Verrucosispora*; es particularmente preferible *Kribbella flava* como el microorganismo clasificado como *Kribbella*; son particularmente preferibles *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium urealyticum* y *Corynebacterium kroppenstedtii* como el microorganismo clasificado como *Corynebacterium*; son particularmente preferibles *Nocardia farcinica*, *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia cyriacigeorgica* como el microorganismo clasificado como *Nocardia*; son particularmente preferibles *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus rhodnii*, *Rhodococcus corallinus*, *Rhodococcus rubropertinctus*, *Rhodococcus coprophilus*,
 60 *Rhodococcus globerulus*, *Rhodococcus chlorofenolicus*, *Rhodococcus luteus*, *Rhodococcus aichiensis*, *Rhodococcus chubuensis*, *Rhodococcus maris* y *Rhodococcus fascines* como el microorganismo clasificado como *Rhodococcus*; son particularmente preferibles *Gordonia bronchialis*, *Gordonia neofelafae* y *Gordonia terrae* como el microorganismo clasificado como *Gordonia*; es particularmente preferible *Dietzia cinnamea* como el microorganismo clasificado como *Dietzia*; son particularmente preferibles *Mycobacterium tuberculosis*,
 65

Mycobacterium bovis, Mycobacterium leprae, Mycobacterium avium, Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium ulcerans, Mycobacterium vanbaalenii, Mycobacterium gilvum, Mycobacterium abscessus, Mycobacterium marinu, Mycobacterium massiliense, Mycobacterium phlei, Mycobacterium thermoresistibile, Mycobacterium tusciae, Mycobacterium xenopi y Mycobacterium rhodesiae como el microorganismo clasificado como *Mycobacterium*; es particularmente preferible *Amycolicicoccus subflavus* como el microorganismo clasificado como *Amycolicicoccus*; es particularmente preferible *Tsukamurella paurometabola* como el microorganismo clasificado como *Tsukamurella*; es particularmente preferible *Segniliparus rotundus* como el microorganismo clasificado como *Segniliparus*; es particularmente preferible *Microbacterium testaceum* como el microorganismo clasificado como *Microbacterium*; es particularmente preferible *Micrococcus luteus* como el microorganismo clasificado como *Micrococcus*; son particularmente preferibles *Arthrobacter arilaitensis*, *Arthrobacter chlorofenolicus*, *Arthrobacter globiformis* y *Arthrobacter fenanthrenivorans* como el microorganismo clasificado como *Arthrobacter*; es particularmente preferible *Renibacterium salmoninarum* como el microorganismo clasificado como *Renibacterium*; es particularmente preferible *Kocuria rhizophila* como el microorganismo clasificado como *Kocuria*; es particularmente preferible *Kytococcus sedentarius* como el microorganismo clasificado como *Kytococcus*; es particularmente preferible *Cellulomonas fimi* como el microorganismo clasificado como *Cellulomonas*; es particularmente preferible *Intrasporangium calvum* como el microorganismo clasificado como *Intrasporangium*; es particularmente preferible *Serinicoccus profundi* como el microorganismo clasificado como *Serinicoccus*; es particularmente preferible *Frankia alni* como el microorganismo clasificado como *Frankia*; es particularmente preferible *Acidothermus cellulolyticus* como el microorganismo clasificado como *Acidothermus*; es particularmente preferible *Nakamurella multipartita* como el microorganismo clasificado como *Nakamurella*; es particularmente preferible *Geodermatophilus obscurus* como el microorganismo clasificado como *Geodermatophilus*; es particularmente preferible *Stackebrandtia nassauensis* como el microorganismo clasificado como *Stackebrandtia*; son particularmente preferibles *Streptomyces albus*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces bingchenggensis*, *Streptomyces chartreusis*, *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces coelicoflavus*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces ghanaensis*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces roseosporus*, *Streptomyces scabiei*, *Streptomyces sviceus*, *Streptomyces venezuelae*, *Streptomyces violaceusniger* y *Streptomyces viridochromogenes* como el microorganismo clasificado como *Streptomyces*; es particularmente preferible *Catenulispora acidiphila* como el microorganismo clasificado como *Catenulispora*; es particularmente preferible *Rubrobacter xilanophilus* como el microorganismo clasificado como *Rubrobacter*; es particularmente preferible *Conexibacter woeselii* como el microorganismo clasificado como *Conexibacter*; son particularmente preferibles *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pseudofirmus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis* como el microorganismo clasificado como *Bacillus*; son particularmente preferibles *Geobacillus caldoproteolyticus*, *Geobacillus caldoxylosilyticus*, *Geobacillus debilis*, *Geobacillus galactosidasius*, *Geobacillus gargensis*, *Geobacillus jurassicus*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus lituanicus*, *Geobacillus pallidus*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus stromboliensis*, *Geobacillus subterraneus*, *Geobacillus tepidamans*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus thermoglucoSIDASius*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus toebii*, *Geobacillus uzensis*, *Geobacillus vulcani* y *Geobacillus zalihae* como el microorganismo clasificado como *Geobacillus*; es particularmente preferible *Oceanobacillus iheyensis* como el microorganismo clasificado como *Oceanobacillus*; es particularmente preferible *Lysinibacillus sphaericus* como el microorganismo clasificado como *Lysinibacillus*; es particularmente preferible *Halobacillus halophilus* como el microorganismo clasificado como *Halobacillus*; es particularmente preferible *Aliciclobacillus acidocaldarius* como el microorganismo clasificado como *Aliciclobacillus*; es particularmente preferible *Kyridia tuscii* como el microorganismo clasificado como *Kyridia*; son particularmente preferibles *Paenibacillus polimyxa*, *Paenibacillus mucilaginosus* y *Paenibacillus terrae* como el microorganismo clasificado como *Paenibacillus*; es particularmente preferible *Lactobacillus buchneri* como el microorganismo clasificado como *Lactobacillus*; son particularmente preferibles *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium kuyveri*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium difficile* y *Clostridium sticklandii* como el microorganismo clasificado como *Clostridium*; son particularmente preferibles *Alkaliphilus metallireducens* y *Alkaliphilus oremlandii* como el microorganismo clasificado como *Alkaliphilus*; es particularmente preferible *Syntrophomonas wolfei* como el microorganismo clasificado como *Syntrophomonas*; es particularmente preferible *Syntrophothermus lipocalidus* como el microorganismo clasificado como *Syntrophothermus*; son particularmente preferibles *Eubacterium rectale* y *Eubacterium limosum* como el microorganismo clasificado como *Eubacterium*; es particularmente preferible *Desulfitobacterium haefleii* como el microorganismo clasificado como *Desulfitobacterium*; es particularmente preferible *Desulfotomaculum reducers* como el microorganismo clasificado como *Desulfotomaculum*; es particularmente preferible *Pelotomaculum thermopropionicum* como el microorganismo clasificado como *Pelotomaculum*; es particularmente preferible *Butyrivibrio proteoeclasticus* como el microorganismo clasificado como *Butyrivibrio*; es particularmente preferible *Roseburia hominis* como el microorganismo clasificado como *Roseburia*; es particularmente preferible *Oscillibacter valericigenes* como el microorganismo clasificado como *Oscillibacter*; es particularmente preferible *Thermoanaerobacter tengcongensis* como el microorganismo clasificado como *Thermoanaerobacter*; es particularmente preferible *Carboxydothermus hydrogenoformans* como el microorganismo clasificado como *Carboxydothermus*; es particularmente preferible *Natranaerobius thermophilus* como el microorganismo clasificado como *Natranaerobius*; son particularmente preferibles *Sphingobacterium multivorum*, *Sphingobacterium spiritivorum*, *Sphingobacterium alimentarium*, *Sphingobacterium anhuiense*, *Sphingobacterium antarcticum*, *Sphingobacterium bambusae*, *Sphingobacterium canadense*, *Sphingobacterium composti*, *Sphingobacterium daejeonense*, *Sphingobacterium faecium*, *Sphingobacterium heparinum*, *Sphingobacterium kitahiroshimense*, *Sphingobacterium lactis*, *Sphingobacterium mizutaii*, *Sphingobacterium nematocida*, *Sphingobacterium piscium*, *Sphingobacterium shayense*, *Sphingobacterium siyangense*, *Sphingobacterium*

5 *thalpophilum* y *Sphingobacterium wenxiniae* como el microorganismo clasificado como *Sphingobacterium*; son particularmente preferibles *Pedobacter steynii*, *Pedobacter duraquae*, *Pedobacter metabolipauper*, *Pedobacter hartonius*, *Pedobacter heparinus*, *Pedobacter africanus*, *Pedobacter agri*, *Pedobacter alluvius* y *Pedobacter saltans* como el microorganismo clasificado como *Pedobacter*; es particularmente preferible *Haliscomenobacter hydrossis* como el microorganismo clasificado como *Haliscomenobacter*; son particularmente preferibles *Porphyromonas gingivalis* y *Porphyromonas asaccharolytica* como el microorganismo clasificado como *Porphyromonas*; es particularmente preferible *Odoribacter splanchnicus* como el microorganismo clasificado como *Odoribacter*; es particularmente preferible *Spirosoma linguale* como el microorganismo clasificado como *Spirosoma*; es particularmente preferible *Runella slithyformis* como el microorganismo clasificado como *Runella*; son particularmente preferibles *Deinococcus radiodurans*, *Deinococcus geothermalis*, *Deinococcus deserti*, *Deinococcus maricopensis*, *Deinococcus proteolyticus* y *Deinococcus gobiensis* como el microorganismo clasificado como *Deinococcus*; son particularmente preferibles *Thermus thermophilus* y *Thermus scotoductus* como el microorganismo clasificado como *Thermus*; son particularmente preferibles *Meiothermus ruber* y *Meiothermus silvanus* como el microorganismo clasificado como *Meiothermus*; es particularmente preferible *Oceanithermus profundus* como el microorganismo clasificado como *Oceanithermus*; es particularmente preferible *Marinithermus hydrothermalis* como el microorganismo clasificado como *Marinithermus*; es particularmente preferible *Gemmimonas aurantiaca* como el microorganismo clasificado como *Gemmimonas*; es particularmente preferible *Fusobacterium nucleatum* como el microorganismo clasificado como *Fusobacterium*; es particularmente preferible *Ilyobacter polytropus* como el microorganismo clasificado como *Ilyobacter*; es particularmente preferible *Roseiflexus castenholzii* como el microorganismo clasificado como *Roseiflexus*; es particularmente preferible *Herpetosiphon aurantiacus* como el microorganismo clasificado como *Herpetosiphon*; es particularmente preferible *Thermomicrombium roseum* como el microorganismo clasificado como *Thermomicrombium*; es particularmente preferible *Thermotoga lettingae* como el microorganismo clasificado como *Thermotoga*; son particularmente preferibles *Thermosiphon melanesiensis* y *Thermosiphon africanus* como el microorganismo clasificado como *Thermosiphon*; es particularmente preferible *Fervidobacterium nodosum* como el microorganismo clasificado como *Fervidobacterium*; es particularmente preferible *Deferribacter desulfuricans* como el microorganismo clasificado como *Deferribacter*; es particularmente preferible *Calditerrivibrio nitroreducens* como el microorganismo clasificado como *Calditerrivibrio*; es particularmente preferible *Flexistipes sinusarabici* como el microorganismo clasificado como *Flexistipes*; es particularmente preferible *Metallosphaera sedula* como el microorganismo clasificado como *Metallosphaera*; es particularmente preferible *Aeropyrum pernix* como el microorganismo clasificado como *Aeropyrum*; son particularmente preferibles *Pyrobaculum aerophilum*, *Pyrobaculum islandicum*, *Pyrobaculum calidifontis* y *Pyrobaculum neutrophilum* como el microorganismo clasificado como *Pyrobaculum*; es particularmente preferible *Caldivirga maquilingensis* como el microorganismo clasificado como *Caldivirga*; es particularmente preferible *Vulcanisaeta distributa* como el microorganismo clasificado como *Vulcanisaeta*; es particularmente preferible *Acidilobus saccharovorans* como el microorganismo clasificado como *Acidilobus*; es particularmente preferible *Haloarcula marismortui* como el microorganismo clasificado como *Haloarcula*; es particularmente preferible *Haloquadratum walsbyi* como el microorganismo clasificado como *Haloquadratum*; es particularmente preferible *Natronomonas pharaonis* como el microorganismo clasificado como *Natronomonas*; es particularmente preferible *Halorubrum lacusprofundi* como el microorganismo clasificado como *Halorubrum*; es particularmente preferible *Haloterrigena turkmenica* como el microorganismo clasificado como *Haloterrigena*; es particularmente preferible *Natrialba magadii* como el microorganismo clasificado como *Natrialba*; es particularmente preferible *Halalkalicoccus jeotgali* como el microorganismo clasificado como *Halalkalicoccus*; es particularmente preferible *Halogeometricum borinquense* como el microorganismo clasificado como *Halogeometricum*; son particularmente preferibles *Thermoplasma acidophilum* y *Thermoplasma volcanium* como el microorganismo clasificado como *Thermoplasma*; es particularmente preferible *Picrophilus torridus* como el microorganismo clasificado como *Picrophilus*; es particularmente preferible *Ferroplasma acidarmanus* como el microorganismo clasificado como *Ferroplasma*; son particularmente preferibles *Archaeoglobus fulgidus* y *Archaeoglobus veneficus* como el microorganismo clasificado como *Archaeoglobus*; es particularmente preferible *Ferroglobus placidus* como el microorganismo clasificado como *Ferroglobus*; es particularmente preferible *Polymorphum gilvum* como el microorganismo clasificado como *Polymorphum*; es particularmente preferible *Micavibrio aeruginosavorus* como el microorganismo clasificado como *Micavibrio*; es particularmente preferible *Simiduia agarivorans* como el microorganismo clasificado como *Simiduia*; es particularmente preferible *Leptothrix cholodnii* como el microorganismo clasificado como *Leptothrix*; es particularmente preferible *Thiomonas intermedia* como el microorganismo clasificado como *Thiomonas*; es particularmente preferible *Rubrivivax gelatinosus* como el microorganismo clasificado como *Rubrivivax*; es particularmente preferible *Metilibium petroleiphilum* como el microorganismo clasificado como *Metilibium*; y es particularmente preferible *Anaerococcus prevotii* como el microorganismo clasificado como *Anaerococcus*.

60 Los microorganismos ejemplificados en el presente documento pueden obtenerse de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), National Institute of Technology and Evaluation, Biotechnology Division, Biological Resource Center (NBRC), National Institute of Advanced Industrial Science y Technology, Patent Organism Depository (FERM), o similares.

Procedimiento de síntesis de éster del ácido metacrílico

65 La producción de éster del ácido metacrílico puede realizarse mediante el siguiente método. Se preparó una disolución añadiendo alcohol o fenol representado por la fórmula 2 y metacrilil-CoA a un disolvente, y luego

permitiendo que se disolviera o suspendiera. Entonces, se pone en contacto AAT con esta disolución o suspensión, y se permite que metacrilil-CoA y el alcohol o fenol reaccionen mientras se controlan las condiciones tales como temperatura. Por medio de la reacción, se transfiere un grupo metacrílico de metacrilil-CoA al alcohol o fenol de fórmula 2, provocando de ese modo que se forme éster del ácido metacrílico.

- 5 La disolución que contiene la metacrilil-CoA y alcohol o fenol representado por la fórmula 2 se prepara normalmente en un medio acuoso tal como una disolución de tampón. En el presente documento, con el fin de provocar que la reacción progrese suavemente, es posible controlar la concentración osmolar y/o fuerza iónica por medio de un regulador de la presión osmótica o similar. Como regulador de la presión osmótica, es suficiente si una sustancia soluble en agua añadida con el objeto de ajustar la presión osmótica de la disolución tal como el interior de la célula para hacerla isotónica o hipertónica, y por ejemplo, es una sal o sacárido, y preferiblemente una sal. La sal es preferiblemente una sal metálica, más preferiblemente una sal de metal alcalino, incluso más preferiblemente un haluro de metal alcalino, y por ejemplo, pueden ejemplificarse cloruro de sodio y cloruro de potasio. El sacárido es preferiblemente un monosacárido u oligosacárido, más preferiblemente un monosacárido o disacárido, y por ejemplo, pueden ejemplificarse glucosa, sacarosa, manitol y similares. El regulador de la presión osmótica se añade preferiblemente a una concentración de al menos 1 mM, y es de manera particularmente preferible para regular para hacerla isotónica o hipertónica en comparación con una disolución dentro de la célula biológica usada.
- 10 Además, con el objeto de separar el éster del ácido metacrílico así formado, puede añadirse un disolvente orgánico de antemano para hacer que reaccione en un sistema de dos fases. Como disolvente orgánico, por ejemplo, puede usarse un hidrocarburo alifático lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado, o similar individualmente o mezclando dos o más tipos. Más específicamente, por ejemplo, pueden ejemplificarse disolventes de hidrocarburo (por ejemplo, pentano, hexano, ciclohexano, benceno, tolueno, xileno, etc.), disolventes de hidrocarburo halogenado (por ejemplo, cloruro de metileno, cloroformo, etc.), disolventes de éter (por ejemplo, dietil éter, dipropil éter, dibutil éter, terc-butil metil éter, dimetoxietano, etc.), disolventes de éster (por ejemplo, formato de metilo, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de butilo, propionato de metilo), y similares. Añadiendo estos disolventes orgánicos, el éster del ácido metacrílico formado migrará a la fase orgánica, y la reacción puede progresar eficazmente.
- 15 Las razones molares y concentraciones de metacrilil-CoA y el alcohol o fenol representado por la fórmula 2 en la disolución de reacción son arbitrarias, y no están particularmente limitadas. Además, la cantidad de AAT usada o las condiciones de reacción se determinan según sea apropiado según las materias primas usadas. Habitualmente, la concentración de cada materia prima se ajusta al intervalo del 0,0000001 al 10 % en masa en el caso de metacrilil-CoA, y el alcohol o fenol se añade a una concentración de 0,1 a 1000 veces en moles, preferiblemente de 0,5 a 50 veces en moles, en relación con la metacrilil-CoA usada.
- 20 Otras diversas condiciones tales como la temperatura de reacción o el tiempo de reacción se determinan según sea apropiado según las materias primas usadas, la actividad de la enzima, etc., y no están particularmente limitadas; sin embargo, es suficiente normalmente si se permite que reaccionen a de 5 °C a 80 °C durante de 1 hora a 1 semana. A de 10 °C a 70 °C, es preferiblemente durante de 1 a 120 horas, más preferiblemente al menos 3 horas, y 4 o más horas es incluso más preferible. Es preferible seleccionar condiciones mediante las cuales la reacción se completa en tales condiciones. El pH de la disolución de reacción no está particularmente limitado siempre que la reacción progrese eficazmente; sin embargo, por ejemplo, es un intervalo de pH 4 a 10, y preferiblemente de pH 5,5 a 8,5.
- 25 Como condiciones ideales para provocar que se recoja éster del ácido metacrílico en al menos 0,001 mM, se prepara de modo que la concentración de metacrilil-CoA en la condición de pH 5,5 a 7,5 esté en el intervalo del 0,000001 al 1 % en masa directa o indirectamente, y el alcohol o fenol se ajusta a una concentración para que sea de 1 a 50 veces en moles en relación con la metacrilil-CoA usada. Entonces, se ajusta la temperatura al intervalo de 20 °C a 40 °C, y se permite la reacción durante al menos 3 horas. También es posible suministrar de manera continua estas materias primas (sustrato) para que estén en los intervalos mencionados anteriormente, y la concentración de acumulación de producto puede elevarse haciendo esto.
- 30 La realización de la presente reacción a presión reducida o condiciones de aireación también es eficaz. Es porque, en estas condiciones, el éster del ácido metacrílico así formado puede separarse de manera continua, como resultado de lo cual la reacción puede progresar eficazmente.
- 35 En el caso de producir éster del ácido metacrílico usando metacrilil-CoA transformada mediante la acción de ACD con isobutiril-CoA como materia prima o metacrilil-CoA transformada mediante la acción de ECH a partir de 3-hidroxiisobutiril-CoA, es preferible implementarlo mediante ajuste para que esté en el intervalo de estas condiciones. Debe indicarse que la reacción de síntesis de metacrilil-CoA a partir de ACD o ECH puede realizarse mediante un método conocido (por ejemplo, como condiciones de reacción para ACD, las condiciones descritas en Microbiology (1999), 145, págs. 2323-2334). Mediante combinación con aún otra reacción biológica, se hace posible una reacción continua (producción fermentativa) dentro de un organismo para éster del ácido metacrílico.
- 40 El éster del ácido metacrílico formado mediante el método de la presente invención puede analizarse cualitativa o cuantitativamente por medio de cromatografía de gases (CG), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), o

similar según sea necesario.

- El aislamiento del éster del ácido metacrílico a partir de la disolución de reacción puede realizarse mediante un método de purificación individual conocido o una combinación de métodos de purificación conocidos tales como destilación, destilación en capa fina, extracción con disolvente y separación en columna. Además, el éster del ácido metacrílico obtenido puede polimerizarse mediante un método típico, y usarse sin inferioridad en usos convencionales.
- El éster del ácido metacrílico obtenido de este modo o polímero del mismo puede reducir notablemente la energía, los recursos y la carga sobre el medio ambiente, y tiene un valor social extremadamente grande como material de baja carga medioambiental en comparación con productos químicos convencionales con productos de petróleo como materiales de partida.
2. Método para producir éster del ácido metacrílico a partir de precursor por microorganismo modificado genéticamente
- Microorganismo recombinante que tiene capacidad de formación de éster del ácido metacrílico a partir de precursor
- Tal como se mencionó en lo anterior, con la presente invención, también es posible sintetizar éster del ácido metacrílico a partir de un precursor tal como isobutiril-CoA, 3-hidroxiisobutiril-CoA o ácido 2-isovalérico, introduciendo el gen de ACD, gen de ECH, gen de BCKAD o similar según sea necesario en un microorganismo en el que se ha introducido el gen de AAT.
- "Precursor" indica un compuesto que puede inducirse a metacrilil-CoA, e indica isobutiril-CoA o 3-hidroxiisobutiril-CoA, y además, la materia de una sustancia inducible a estos dos compuestos. Como sustancia inducible a dos compuestos, por ejemplo, pueden ejemplificarse ácidos tales como ácido 2-oxoisovalérico, ácido isobutírico, ácido 3-hidroxiisobutírico, ácido acético, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido acetoacético, ácido butírico, ácido propiónico, ácido mágico, ácido fumárico, ácido cítrico y ácido succínico; aminoácidos tales como valina, alanina, leucina, lisina y ácido glutámico; y sacáridos tales como glucosa, fructosa y xilosa.
- Para provocar que se forme éster del ácido metacrílico a partir de estos precursores, también es posible utilizar diversas rutas metabólicas que posee de manera natural el microorganismo huésped. Pueden introducirse genes o hacer que sea deficiente según sea necesario.
- (1) Microorganismo huésped
- Como microorganismo huésped, no está particularmente limitado siempre que sea un huésped que tenga enzimas para formar metacrilil-CoA a partir del precursor y capacidad de expresión de AAT; sin embargo, con respecto a bacterias, pueden ejemplificarse *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, etc., con respecto a levaduras, pueden ejemplificarse *Saccharomyces*, *Candida*, *Shizosaccharomyces* y *Pichia*, y con respecto a hongos filamentosos, puede ejemplificarse *Aspergillus*, etc.
- Un microorganismo del género *Rhodococcus* es preferible como huésped. El motivo de lo mismo se debe al conocimiento al que se llega confirmando experimentalmente en el transcurso de la presente invención que un microorganismo del género *Rhodococcus* tiene capacidad de asimilación de valina, y el hallazgo de que, utilizando esta función, es posible aplicarlo a la formación de éster del ácido metacrílico mediante la ruta mostrada en la figura 2.
- Por ejemplo, un tipo seleccionado de los siguientes microorganismos puede usarse individualmente, o combinando dos o más tipos. Como microorganismos clasificados como *Rhodococcus sp.*, por ejemplo, pueden ejemplificarse *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus rhodnii*, *Rhodococcus corallinus*, *Rhodococcus rubropertinctus*, *Rhodococcus coprophilus*, *Rhodococcus globerulus*, *Rhodococcus chlorofenolicus*, *Rhodococcus luteus*, *Rhodococcus aichiensis*, *Rhodococcus chubuensis*, *Rhodococcus maris*, *Rhodococcus fascines* y similares.
- Como ejemplo preferido, puede ejemplificarse *Rhodococcus erythropolis*. Como cepas más preferidas, pueden ejemplificarse *Rhodococcus erythropolis* cepa PR-4, *Rhodococcus erythropolis* cepa KA2-5-1, *Rhodococcus erythropolis* cepa IGT88, *Rhodococcus erythropolis* cepa D-1, *Rhodococcus erythropolis* cepa H-2, *Rhodococcus erythropolis* cepa N1-36, *Rhodococcus erythropolis* cepa I-19, *Rhodococcus erythropolis* cepa ECRD-1, *Rhodococcus erythropolis* cepa B1, *Rhodococcus erythropolis* cepa SY-1, *Rhodococcus erythropolis* cepa UM3, *Rhodococcus erythropolis* cepa UM9, *Rhodococcus equi* cepa T09, o similares, y de manera particularmente preferible, puede ejemplificarse *Rhodococcus erythropolis* cepa PR-4. Además, se incluyen derivados de estas cepas.
- Como derivados, se incluyen cepas variantes obtenidas induciendo mutación génica en un microorganismo que tiene capacidad de formación de metacrilil-CoA por medio de un cambio en las condiciones de cultivo (por ejemplo,

composición del medio, temperatura, etc.), tratamiento químico o físico (por ejemplo, radiación γ , etc.), cepas modificadas genéticamente para las que se ha potenciado la actividad del siguiente modo, o la actividad se ha hecho deficiente o se ha reducido.

- 5 La potenciación de la actividad indica el nivel de expresión del gen de la enzima (independientemente del origen) que aumenta en el microorganismo basándose en el gen introducido desde fuera de la célula bacteriana en el microorganismo, y además de introducir genes que codifican enzimas desde fuera de la célula bacteriana del microorganismo al interior de la célula bacteriana, incluye potenciar la actividad enzimática como resultado de provocar que el gen de la enzima se exprese altamente potenciando la actividad del promotor del gen de la enzima retenido en el genoma por el microorganismo, o sustituyéndolo por otro promotor, o alternativamente, reduciendo o inactivando la actividad represora del gen de la enzima.

La cepa modificada genéticamente puede ser una cepa modificada a la que se llega realizando modificación genética provocando que la actividad de la enzima que inhibe la reacción de síntesis de metacrilil-CoA se desactive o disminuya. Actividad "deficiente" o "disminuida" indica que la expresión del gen de la enzima se pierde completamente o se reduce en este microorganismo, y además de la sustitución, delección o inserción que se producen para este gen de la enzima, incluye disminuir la actividad enzimática como resultado de suprimir la expresión del gen de la enzima disminuyendo la actividad del promotor de un gen de la enzima retenido en el genoma por el microorganismo o sustituyéndolo por otro promotor, o alternativamente potenciando o activando la actividad represora de este gen de la enzima. Debe indicarse que estas modificaciones genéticas pueden realizarse siguiendo un método convencional.

Como cepa modificada preferida en el caso de realizar la producción del éster del ácido metacrílico mediante la ruta mostrada en la figura 2, puede ejemplificarse una cepa modificada que tiene al menos una característica de (a) o (b) mostradas a continuación.

(a) La actividad de formación de metacrilil-CoA se potencia por el gen de BCKAD y/o gen de ACD introducidos.

(b) La actividad de formación de metacrilil-CoA se potencia mediante desactivación o inactivación del gen de ECH, gen de 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa y/o gen de ácido 3-hidroxiisobutírico deshidrogenasa. La inactivación o desactivación se realiza sustituyendo, delecionando o insertando la totalidad del gen o parte de la secuencia de nucleótidos.

(2) Gen insertado

Se hace necesario introducir genes de enzimas respectivos para formar metacrilil-CoA a partir del precursor y el gen de AAT según sea necesario en el huésped. Diversas enzimas que posee de manera natural el microorganismo huésped pueden utilizarse tal cual. Alternativamente, también es posible potenciar la actividad por medio de introducción de genes según sea necesario.

Según el huésped y la ruta de síntesis, la enzima para formar metacrilil-CoA a partir del precursor se selecciona según sea apropiado o se optimiza, y no está particularmente limitada; sin embargo, a continuación en el presente documento, los genes de enzimas necesarios para la formación del éster del ácido metacrílico mediante la ruta mostrada en la figura 2 se describirán en detalle usando un microorganismo del género *Rhodococcus* como huésped.

(2-1) Alcohol aciltransferasa (AAT)

La AAT usada en la presente invención no está particularmente limitada siempre que tenga la capacidad de producir éster del ácido metacrílico con metacrilil-CoA y alcohol o fenol como materias primas, y la clase y el origen de la misma no son de importancia. Una de origen vegetal es preferible como fuente de la enzima, y como fuentes representativas de la misma, pueden ejemplificarse las que se originan a partir de cualquier orden seleccionado del grupo que consiste en los Zingiberales, Rosales, Ericales, Cucurbitales, Brassicales y Laurales mencionados anteriormente.

(2-2) Acil-CoA deshidrogenasa (ACD)

La ACD usada en la presente divulgación no está particularmente limitada siempre que tenga la capacidad de formar metacrilil-CoA a partir de acil-CoA, y la fuente y el tipo de la misma no son de importancia. Son preferibles las derivadas de microorganismos, y son representativas las que se mostraron anteriormente.

Más preferiblemente, se deriva de *Rhodococcus erythropolis*, y como cepas preferidas, pueden ejemplificarse *Rhodococcus erythropolis* cepa PR-4, *Rhodococcus erythropolis* cepa KA2-5-1, *Rhodococcus erythropolis* cepa IGETS8, *Rhodococcus erythropolis* cepa D-1, *Rhodococcus erythropolis* cepa H-2, *Rhodococcus erythropolis* cepa N1-36, *Rhodococcus erythropolis* cepa I-19, *Rhodococcus erythropolis* cepa ECRD-1, *Rhodococcus erythropolis* cepa B1, *Rhodococcus erythropolis* cepa SY-1, *Rhodococcus erythropolis* cepa UM3, *Rhodococcus erythropolis*

cepa UM9, *Rhodococcus equi* cepa T09, o similares, y de manera particularmente preferible, puede ejemplificarse *Rhodococcus erythropolis* cepa PR-4.

- 5 La secuencia de nucleótidos del gen de ACD derivado de *Rhodococcus erythropolis* cepa PR-4 se muestra en SEQ ID NO. 33, y la secuencia de aminoácidos codificada por esta secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ ID NO. 32. Debe indicarse que se incluyen las secuencias de aminoácidos en las que uno o una pluralidad de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 32 se han sustituido, delecionado o añadido, y también se incluyen genes que codifican proteínas que tienen actividad para formar metacrilil-CoA a partir de acil-CoA en el gen de ACD de la presente divulgación. Además, en el gen de ACD de la presente divulgación, también se incluyen genes que codifican una proteína que tiene actividad para producir éster del ácido metacrílico a partir de acil-CoA que expresa una identidad de al menos el 90 % con la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO. 32, preferiblemente al menos el 95 %, más preferiblemente al menos el 99,5 % e incluso más preferiblemente al menos el 99,9 %.
- 10 15 Además, en el gen de ACD de la presente divulgación, también se incluyen genes que se hibridan en condiciones rigurosas con un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada por SEQ ID NO. 33, y proteínas codificantes que tienen actividad para formar éster del ácido metacrílico a partir de acil-CoA. Además, en el gen de ACD de la presente divulgación, cuando se calcula usando la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO. 33, BLAST, etc. (por ejemplo, parámetros por defecto, es decir, configuración 20 inicial), también se incluyen genes que codifican proteínas que tienen actividad para formar éster del ácido metacrílico a partir de acil-CoA y alcohol que consisten en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 90 % y lo más preferiblemente al menos el 95 %. Además, los codones del gen de ACD mencionado anteriormente pueden cambiarse según la frecuencia de uso de codones en el microorganismo usado en la transformación.
- 25 30 Se introduce el ADN que para el gen de AAT y/o gen de ACD mencionados anteriormente en un microorganismo que pertenece a *Rhodococcus sp.*, y se usa para provocar la transcripción/traducción en proteínas en este microorganismo. El ADN introducido en este microorganismo está preferiblemente en la forma incorporada en un vector.
- 35 (3) Preparación de un microorganismo recombinante
- 40 El ADN que codifica el gen de AAT y/o gen de ACD mencionados anteriormente se introduce en el microorganismo huésped, y se usa para provocar la transcripción/traducción en proteínas en este microorganismo. El ADN introducido en este microorganismo está preferiblemente en la forma incorporada en un vector. En otras palabras, cada gen se incorpora en un vector de expresión que puede expresar la célula huésped, y este se introduce en la célula huésped.
- 45 El vector no está limitado particularmente siempre que pueda replicarse de manera autónoma la célula huésped, y retenga el gen de AAT y/o gen de ACD, y es posible usar vectores adecuados a los microorganismos respectivos. Como vector para introducir ADN en un microorganismo que pertenece a *Rhodococcus sp.*, por ejemplo, es posible usar vectores bien conocidos tales como pK1, pK2, pK3 y pK4, así como pSJ034 (se hace referencia a la solicitud de patente japonesa no examinada, publicación n.º H10-337185), pSJ023 y pSJ002 (se hace referencia a la solicitud de patente japonesa no examinada, publicación n.º H10-24867), y pSJ201 y pLK005 (no se limita a estos). pSJ023 está depositado en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Patent Organism Depository como *Rhodococcus rhodochrous* transformante ATCC12674/pSJ023 (FERMBP-6232).
- 50 55 La inserción del gen de AAT y/o gen de ACD mencionados anteriormente en el vector puede llevarse a cabo usando tecnología de recombinación génica conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, es posible utilizar un método que usa escisión y ligación por enzimas de restricción, un método que usa topoisomerasa, un kit In Fusion (Takara Bio), y similares. El gen insertado en el vector se inserta sucesivamente en el sentido de 3' de un promotor capaz de regular la transcripción/traducción de proteínas codificadas por los genes respectivos en el organismo huésped. Además, si es necesario, puede añadirse un ligador apropiado tras la inserción. Además, según sea necesario, puede unirse una secuencia de terminador, secuencia de potenciador, secuencia señal de corte y empalme, secuencia señal de adición de poliA, secuencia de unión al ribosoma tal como la secuencia SD o secuencia Kozak, gen marcador de selección, etc. utilizables en el organismo huésped en el que están intentándose introducir genes. Como ejemplo del gen marcador de selección, además de genes resistentes a fármacos tales como gen resistente a ampicilina, gen resistente a tetraciclina, gen resistente a neomicina, gen resistente a kanamicina y gen resistente a cloranfenicol, pueden ejemplificarse genes que confieren biosíntesis intracelular de nutrientes tales como aminoácidos y ácidos nucleicos, o genes que codifican proteínas fluorescentes tales como luciferasa. Acompañando a la inserción, una parte de la secuencia de aminoácidos codificada por el ADN puede sustituirse.
- 60 65 Desde el punto de vista anterior, es particularmente preferible usar pLK005 adquirido realizando un tratamiento de variación sobre pK4 como vector. El gen de AAT o gen de ACD se une/inserta para que esté dispuesto en el sentido de 3' del extremo 3' del promotor de pLK005, y puede construirse un vector de plásmido de expresión que expresa el

gen de AAT y/o gen de ACD mediante el promotor.

En el vector, puede insertarse cualquier gen seleccionado de la agrupación génica de AAT o la agrupación génica de ACD, y puede insertarse una pluralidad de genes. En el caso de que se use un gen insertado en un vector, la "pluralidad" puede ser la inserción de 2 a 5, de 2 a 4, y preferiblemente 2 o 3 genes. Además, en el caso de que se inserte una pluralidad de genes en un vector, estos genes forman preferiblemente un operón. En el presente documento, "operón" es una unidad de secuencia de ácido nucleico constituida por uno o más genes transcritos bajo el control del mismo promotor.

10 Los genes mencionados anteriormente, y preferiblemente genes en forma de un vector, se insertan en el microorganismo huésped mediante un método conocido por los expertos en la técnica. El método de introducción del vector recombinante en el organismo huésped no está particularmente limitado siempre que sea un método adecuado para el microorganismo huésped y, por ejemplo, pueden ejemplificarse el método de electroporación, el método de esferoplastos, el método de acetato de litio, el método de fosfato de calcio, el método de lipofeción, el método de transferencia por conjugación y similares.

Método para producir éster del ácido metacrílico

20 El microorganismo recombinante en el que se introducen los genes requeridos tales como el gen de AAT y/o el gen de ACD se pone en contacto con el precursor para producir éster del ácido metacrílico. En el presente documento, "contacto" indica el tratamiento de exposición durante un tiempo fijado del microorganismo y una sustancia (precursor). Más específicamente, el microorganismo se cultiva en un medio acuoso que contiene precursor (materia prima), etc., o se añade un cultivo del microorganismo al medio acuoso que contiene materia prima, y se suspende/se mezcla, para obtener éster del ácido metacrílico en el medio acuoso y/o fase gaseosa. Al hacer esto, no es de importancia si hay proliferación del microorganismo. En este procedimiento, se obtiene una mezcla que contiene microorganismo recombinante y éster del ácido metacrílico.

25 "Medio acuoso" indica agua o una disolución acuosa con agua como componente principal, y también incluye aquellas en las que se dispersa un líquido/sólido no disuelto. "Fase gaseosa" se refiere a una porción ocupada por gas, vapor, etc. excluyendo una porción ocupada por líquido (medio de cultivo, etc.) en el tanque de cultivo (recipiente de cultivo de microorganismo) o reactor (recipiente en el que se lleva a cabo la reacción). "Cultivo" indica que se obtiene por medio de un cultivo de células bacterianas, caldo, extracto no celular, membrana celular, o similar.

35 (1) Producción de éster del ácido metacrílico a partir del cultivo

30 En la presente invención, se realiza la producción de éster del ácido metacrílico provocando que se forme y se acumule éster del ácido metacrílico en células bacterianas en cultivo o en el cultivo cultivando microorganismo recombinante génico al que se le ha introducido el gen de AAT en un medio acuoso que contiene el precursor, y recuperando el éster del ácido metacrílico del cultivo de células bacterianas, cultivo o fase gaseosa del recipiente de cultivo.

35 El medio de cultivo usado en el cultivo del microorganismo es un medio sólido o medio líquido, que permite proliferación suficiente, que contiene nutrientes que incluyen al menos diversas fuentes de carbono. En el caso de que el precursor pueda utilizarse como fuente de carbono, puede usarse como fuente de carbono.

40 La concentración de fuente de carbono o precursor en el medio de cultivo no está particularmente limitada siempre que permita la producción de éster del ácido metacrílico. La concentración, por ejemplo, se fija a del 0,05 al 20 % en (p/v), preferiblemente del 0,1 al 15 % en (p/v), y más preferiblemente del 0,2 al 10 % en (p/v). Se usa al menos el 0,2 % en (p/v) porque la productividad de ácido metacrílico de los microorganismos aumenta, y se fija a no más del 10 % en (p/v) porque no se reconoce una mejora drástica en el efecto si se aumenta hasta más de esto.

45 En la producción de éster del ácido metacrílico mediante cultivo, se añade alcohol o fenol dependiendo del éster del ácido metacrílico objetivo. El alcohol o fenol usado es preferiblemente el mostrado por la fórmula 2.

50 La concentración de alcohol o fenol en el medio de cultivo no está particularmente limitada siempre que permita que se produzca el éster del ácido metacrílico. La concentración, por ejemplo, se fija a del 0,01 al 20 % en (p/v), preferiblemente del 0,05 al 10 % en (p/v) y más preferiblemente del 0,1 al 5 % en (p/v). Además, estos también pueden añadirse al medio de cultivo de antemano, o pueden añadirse de manera continua o intermitente dividiéndolos en dos o más apariciones, mientras se realiza el cultivo.

55 En el medio de cultivo, pueden añadirse fuentes de nitrógeno inorgánico, sales de metales inorgánicas o similares. Como fuentes de nitrógeno inorgánico, por ejemplo, pueden usarse ácidos inorgánicos o ácidos orgánicos de sales de amonio tales como cloruro de amonio, sulfato de amonio, acetato de amonio y fosfato de amonio, y similares.

60 La concentración de fuente de nitrógeno en el medio de cultivo no está particularmente limitada siempre que permita

que se produzca el éster del ácido metacrílico. La concentración, por ejemplo, se fija a del 0,01 al 10 % en (p/v), preferiblemente del 0,05 al 8 % en (p/v) y más preferiblemente del 0,1 al 4 % en (p/v).

5 Como sales de metales inorgánicas, por ejemplo, pueden usarse dihidrogenofosfato de potasio, monofosfato de potasio, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, sulfato de cobre, carbonato de calcio, etc.

10 La concentración de sales inorgánicas en el medio de cultivo no está particularmente limitada siempre que permite que se produzca éster del ácido metacrílico. La concentración, por ejemplo, se fija a del 0,001 al 1,6 % en (p/v), preferiblemente del 0,005 al 1,3 % en (p/v) y más preferiblemente del 0,01 al 1 % en (p/v). Se usa al menos el 0,1 % en (p/v) porque la productividad del ácido metacrílico de los microorganismos aumenta, y se fija a no más del 1 % en (p/v) porque no se reconoce una mejora drástica en el efecto incluso si se añade más de esto.

15 Adicionalmente, se añaden oligoelementos, vitaminas, etc. según sea necesario al medio de cultivo. Además, diversas sustancias orgánicas, sustancias inorgánicas, tensioactivo, agente desespumante comúnmente usado, etc. necesarios en el crecimiento del microorganismo pueden añadirse adicionalmente al medio de cultivo según sea necesario.

20 La siembra del microorganismo modificado genéticamente en el medio de cultivo puede llevarse a cabo mediante una técnica convencional, conocida. El método de cultivo no está tampoco particularmente limitado, y es posible usar una técnica conocida tal como cultivo en agitación, cultivo aireado y agitado, y cultivo estático.

25 Las condiciones de cultivo no están particularmente limitadas siempre que el organismo modificado genéticamente crezca y forme éster del ácido metacrílico. El cultivo puede llevarse a cabo en condiciones aerobias o puede llevarse a cabo en condiciones anaerobias.

30 El pH, la temperatura y el tiempo de cultivo no están particularmente limitados siempre que las condiciones permitan que el microorganismo modificado genéticamente crezca y forme éster del ácido metacrílico. El pH se fija preferiblemente a de 3 a 10, más preferiblemente de 4 a 9 e incluso más preferiblemente de 5 a 8. La temperatura se fija preferiblemente a de 10 °C a 45 °C, más preferiblemente de 15 °C a 40 °C e incluso más preferiblemente de 20 °C a 35 °C. El tiempo de cultivo es preferiblemente de 10 a 1000 horas, más preferiblemente de 15 a 480 horas e incluso más preferiblemente de 20 a 240 horas.

35 Estas condiciones de cultivo se seleccionan u optimizan apropiadamente para cada cepa para maximizar la razón de rendimiento de éster del ácido metacrílico en relación con la cantidad utilizada de fuente de carbono o precursor. Debe indicarse que el rendimiento del éster del ácido metacrílico puede ajustarse ajustando apropiadamente la cantidad de fuente de carbono y las condiciones de cultivo.

40 Como condiciones ideales para provocar que se acumule éster del ácido metacrílico en al menos 0,001 mM, en una condición de pH de 5,5 a 7,5, la concentración de fuente de carbono o precursor en el medio de cultivo se mantiene directa o indirectamente a al menos el 0,1 %, la concentración de alcohol o fenoles se mantiene directa o indirectamente a al menos el 0,1 %, la temperatura se ajusta al intervalo de 20 °C a 40 °C, y se permite que reaccione durante al menos 3 horas. Además, es preferible con el fin de obtener una productividad eficaz mantener un estado en el que la concentración de microorganismo en la disolución de cultivo es alta en un intervalo en el que el entorno de la disolución de cultivo no se vuelve inapropiada para la proliferación del microorganismo o las células cultivadas y la razón de células que mueren no aumenta y, por ejemplo, manteniendo en al menos 2 g/l como peso seco, se obtiene una eficacia de producción favorable, y la concentración de acumulación de la producción puede elevarse.

50 (2) Producción de éster del ácido metacrílico a partir de reacción de microorganismos en reposo

55 Con el método para producir éster del ácido metacrílico según la presente invención, puede emplearse el siguiente método además del método cultivando microorganismo modificado genéticamente tal como se describió anteriormente. No es necesario que el microorganismo modificado genéticamente tenga actividad reproductora, y puede ponerse en contacto un cultivo precultivado con un medio acuoso que contiene precursor para producir éster del ácido metacrílico por reacción de microorganismos en reposo no acompañada por proliferación sustancial.

60 La concentración del precursor usado en la reacción de microorganismos en reposo puede ser la misma que el caso mencionado anteriormente de producción de éster del ácido metacrílico a partir de cultivo. El alcohol o fenol usado en la reacción de microorganismos en reposo y la concentración del mismo puede ser la misma que el caso mencionado anteriormente de producción de éster del ácido metacrílico mediante cultivo.

65 Pueden añadirse sales de metales inorgánicas, etc. a la disolución de reacción. Como sales de metales inorgánicas, por ejemplo, pueden usarse dihidrogenofosfato de potasio, monofosfato de potasio, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, sulfato de cobre, carbonato de calcio, etc.

La concentración de sales inorgánicas en la disolución de reacción no está particularmente limitada siempre que permita que se produzca éster del ácido metacrílico. La concentración, por ejemplo, se fija a del 0,0001 al 2 % en (p/v), preferiblemente del 0,0003 al 1,3 % en (p/v) y más preferiblemente del 0,001 al 1 % en (p/v).

5 Adicionalmente, se añaden oligoelementos, vitaminas, etc. según sea necesario a la disolución de reacción. Además, diversas sustancias orgánicas, sustancias inorgánicas, tensioactivo, agente desespumante comúnmente usado, etc. necesarios en la reacción pueden añadirse adicionalmente a la disolución de reacción según sea necesario.

10 En la reacción de microorganismos en reposo, la disolución de cultivo de microorganismo modificado genéticamente precultivado se usa tal cual, o se usan células bacterianas recuperadas mediante filtración, centrifugación o similar. El cultivo recuperado se resuspende en una disolución tampón apropiada o similar, y puede usarse estableciendo en cualquier concentración de bacterias. Para la disolución tampón o similar, se usa una disolución salina normal, disolución tampón de fosfato de potasio, disolución tampón de tris-ácido clorhídrico, disolución tampón de glicina-hidróxido de sodio, disolución tampón de ácido bórico-hidróxido de sodio, o similar.

15 Además, en la reacción de microorganismos en reposo, también puede usarse el producto procesado del cultivo recuperado (por ejemplo, homogeneizado, enzima en bruto, enzima purificada, etc.). Además, puede fijarse a un portador apropiado mediante un método conocido, y este producto de fijación puede usarse en la reacción.

20 Las condiciones de reacción no están particularmente limitadas siempre que se forme éster del ácido metacrílico. La reacción puede llevarse a cabo en condiciones aerobias o puede llevarse a cabo en condiciones anaerobias. El método de reacción tampoco está particularmente limitado, y puede usarse una técnica bien conocida tal como reacción de agitación, reacción aireada y agitada y reacción estática.

25 25 El pH, la temperatura y el tiempo de reacción no están particularmente limitados siempre que las condiciones puedan formar éster del ácido metacrílico. El pH se fija preferiblemente a de 3 a 10, más preferiblemente de 4 a 9 e incluso más preferiblemente de 5 a 8. La temperatura se fija preferiblemente a de 10 °C a 45 °C, más preferiblemente de 15 °C a 40 °C e incluso más preferiblemente de 20 °C a 35 °C. El tiempo de reacción es preferiblemente de 5 a 180 horas, más preferiblemente de 10 a 150 horas e incluso más preferiblemente de 15 a 120 horas.

30 35 Estas condiciones de reacción se seleccionan u optimizan apropiadamente para cada cepa para maximizar la razón de rendimiento del éster del ácido metacrílico. Debe indicarse que el rendimiento del éster del ácido metacrílico puede ajustarse ajustando apropiadamente las condiciones de reacción.

35 40 Como condiciones ideales para provocar que se acumule éster del ácido metacrílico en 0,001 mM, en una condición de pH de 5,5 a 7,5, la concentración de fuente de carbono o precursor en el medio de cultivo se mantiene directa o indirectamente a al menos el 0,1 %, la concentración de alcohol o fenoles se mantiene directa o indirectamente a al menos el 0,1 %, la temperatura se ajusta al intervalo de 20 °C a 40 °C y se permite que reaccionen durante al menos 3 horas. Además, mantener un estado en el que la concentración de microorganismo en la disolución de reacción es alta es preferible para obtener una productividad eficaz, y por ejemplo, manteniendo en al menos 2 g/l como peso seco, se obtiene una eficacia de producción favorable, y puede mejorarse la concentración de acumulación de producto.

45 45 En el método para producir éster del ácido metacrílico según la presente invención, la producción mencionada anteriormente de éster del ácido metacrílico a partir del cultivo y la producción de éster del ácido metacrílico a partir de la reacción de microorganismos en reposo pueden llevarse a cabo mediante combinación según sea apropiado. Combinando los dos métodos, se hace posible una producción más eficaz de éster del ácido metacrílico.

50 50 (3) Recuperación de éster del ácido metacrílico

55 55 El éster del ácido metacrílico formado en el medio de cultivo o la disolución de reacción y la cantidad formada del mismo pueden detectarse y medirse usando un método común tal como de cromatografía de líquidos de alta resolución y CLEM. Además, el éster del ácido metacrílico volatilizado en la fase gaseosa del recipiente de cultivo o recipiente de reacción (parte de espacio de cabeza) y la cantidad formada del mismo puede detectarse y medirse usando un método común tal como cromatografía de gases.

60 60 El éster del ácido metacrílico puede separarse y purificarse a partir del medio de cultivo o la disolución de reacción usando una combinación apropiada, según sea necesario, de operaciones bien conocidas tales como filtración, centrifugación, concentración a vacío, cromatografía de intercambio iónico o adsorción, extracción con disolvente, destilación y cristalización.

Ejemplos

65 65 A continuación en el presente documento, aunque la presente invención se explicará específicamente por medio de

ejemplos.

Ejemplo 1: Síntesis de metacrilato de isobutilo

- 5 Se retiró la piel de un plátano, se cortó el sarcocarpio a un grosor de aproximadamente 1 milímetro con una cuchilla y se dividió esto adicionalmente en cuatro. Se añadieron dos gramos de plátano cortado, 2 ml de una disolución que contiene metacrilil-CoA 2,3 mM y 0,35 M de KCl y 5 µl de alcohol isobutílico a un matraz de 100 ml. Se selló y se permitió que reaccionara a 30 °C. Se recogió la mezcla de reacción que contenía metacrilato de isobutilo formado tras 1, 2 o 3 horas en un matraz de 100 ml con un espacio de cabeza de 150 µl, y se realizó el análisis con las condiciones de CG a continuación. Los resultados del mismo se muestran en la tabla 1.

[Tabla 1]

Cantidad generada de metacrilato de isobutilo

Tiempo	Cantidad generada de metacrilato de isobutilo (mM)
1	0,19
2	0,38
3	0,45

Condiciones de análisis de CG

Columna: DB-WAX, 30 m × 0,32 mm

Temperatura de la columna: 50 °C · 5 min -> 5 °C/min -> 100 °C (15 min en total)

Gas portador: He

25 Inyección: 200 °C sin división (tiempo de muestreo 1 min)

Detección: 250 °C FID

30 Volumen de inyección: 150 µl

35 Debe indicarse que la concentración de éster del ácido metacrílico se calculó ajustando una disolución acuosa de una concentración inicial conocida, colocando 2 ml de la misma disolución acuosa en un matraz de 100 ml, y tras incubar durante 30 min a 30 °C, recogiendo el espacio de cabeza mediante el mismo método, sometiendo a análisis de CG y preparando una curva de calibración.

35 Ejemplo 2: Síntesis de metacrilato de butilo

Excepto por usar alcohol n-butílico en lugar de alcohol isobutílico, se realizó de manera similar al ejemplo 1. Los resultados del mismo se muestran en la tabla 2.

40 [Tabla 2]

Cantidad generada de metacrilato de butilo

Tiempo	Cantidad generada de metacrilato de butilo (mM)
2	0,20
5,5	0,30

45 Ejemplo 3: Síntesis 2 de metacrilato de butilo

Se añadieron dos gramos de un trozo de planta mostrada en la tabla 3, 2 ml de una disolución que contenía 2,3 mM de metacrilil-CoA y KCl 0,35 M y 10 µl de alcohol n-butílico a un matraz de 100 ml. Se selló y se permitió que reaccionara a 30 °C. Se realizó el análisis del éster del ácido metacrílico de manera similar al ejemplo 1. Los resultados del mismo se muestran en la tabla 3.

55 [Tabla 3]

55 Cantidad generada de metacrilato de butilo

Planta	Parte usada	Tiempo de reacción	Cantidad generada de metacrilato de butilo (mM)

Fresa	Sarcocarpio cortado hasta un grosor de aproximadamente 1 milésima de pulgada	3	0,010
Kiwi	Sarcocarpio cortado hasta un grosor de aproximadamente 1 milésima de pulgada	5	0,012
Manzana	Pericarpio cortado hasta un grosor de aproximadamente 1 milésima de pulgada	5	0,016
Melón	Sarcocarpio cortado hasta un grosor de aproximadamente 1 milésima de pulgada	6	0,015
Pera	Pericarpio cortado hasta un grosor de aproximadamente 1 milésima de pulgada	4	0,013
Papaya	Pericarpio cortado hasta un grosor de aproximadamente 1 milésima de pulgada	4	0,027
Aguacate	Pericarpio cortado hasta un grosor de aproximadamente 1 milésima de pulgada	6	0,035
Arándano	Pericarpio cortado hasta un grosor de aproximadamente 1 milésima de pulgada	6	0,009
<i>Prunus mume</i>	Pericarpio cortado hasta un grosor de aproximadamente 1 milésima de pulgada	4	0,002

Ejemplo 4: Síntesis de metacrilato de etilo

Se añadieron dos gramos de un trozo de planta mostrada en la tabla 4, 2 ml de una disolución que contenía 2,3 mM de metacrilil-CoA y KCl 0,35 M y 6,4 µl de alcohol etílico a un matraz de 100 ml. Se selló y se permitió que reaccionara a 30 °C. El análisis del éster del ácido metacrílico se realizó de manera similar al ejemplo 1. Los resultados del mismo se muestran en la tabla 4.

[Tabla 4]

Cantidad generada de metacrilato de etilo

Planta	Parte usada	Tiempo de reacción	Cantidad generada de metacrilato de etilo (mM)
Manzana	Pericarpio cortado hasta un grosor de aproximadamente 1 milésima de pulgada	5	0,110
Papaya	Pericarpio cortado hasta un grosor de aproximadamente 1 milésima de pulgada	6	0,003
Aguacate	Pericarpio cortado hasta un grosor de aproximadamente 1 milésima de pulgada	6	0,006

Ejemplo 5: Síntesis de metacrilato de etilo

Se añadieron dos gramos de un trozo de planta mostrada en la tabla 5, 2 ml de una disolución que contenía 2,3 mM de metacrilil-CoA y KCl 0,35 M y 4,4 µl de alcohol metílico a un matraz de 100 ml. Se selló y se permitió que reaccionara a 30 °C. El análisis del éster del ácido metacrílico se realizó de manera similar al ejemplo 1. Los resultados del mismo se muestran en la tabla 5.

[Tabla 5]

Cantidad generada de metacrilato de metilo

Planta	Parte usada	Tiempo de reacción	Cantidad generada de metacrilato de metilo (mM)
Manzana	Pericarpio cortado hasta un grosor de aproximadamente 1 milésima de pulgada	5	0,043
Papaya	Pericarpio cortado hasta un grosor de aproximadamente 1 milésima de pulgada	6	0,004
Aguacate	Pericarpio cortado hasta un grosor de aproximadamente 1 milésima de pulgada	6	0,007

Ejemplo de referencia 1: Preparación de una célula competente

Se inoculó *E. coli* JM109 en 1 ml de medio LB (Bacto-triptona al 1 %, extracto de levadura Bacto al 0,5 %, NaCl al 0,5 %), se precultivó aeróbicamente a 37 °C durante 5 horas, se añadieron 0,4 ml del cultivo a 40 ml de medio SOB (Bacto-triptona al 2 %, extracto de levadura Bacto al 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgSO₄ 1 mM, MgCl₂ 1 mM), y se cultivó a 18 °C durante 20 horas. Tras recoger este cultivo mediante centrifugación, se añadieron 13 ml de una

disolución de TF enfriada (PIPES-KOH 20 mM (pH 6,0), KCl 200 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 40 mM), y se dejó reposar durante 10 minutos a 0 °C. Posteriormente, tras volver a centrifugar para eliminar el sobrenadante, se suspendió la *E. coli* precipitada en 3,2 ml de disolución de TF fría, se añadieron a la misma 0,22 ml de dimetilsulfóxido, y se dejó reposar durante 10 minutos a 0 °C para preparar una célula competente.

5 Ejemplo 6: Preparación de *E. coli* recombinante con gen de AAT introducido derivado de planta

10 Se encomendó la síntesis de los genes de AAT derivados de plantas mostrados en SEQ ID NO: 2, 4 y 6 a Takara Bio Inc. AAT de manzana (MpAAT1): secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1), secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 2)

AAT de fresa (SAAT): secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3), secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 4)

15 AAT de fresa (VAAT): secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5), secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 6)

20 Se insertaron estos segmentos génicos sintetizados en el vector pMD19, y se denominaron respectivamente pAAT001 a 003. (Tabla 6). Con estos pAAT001 a 003 como moldes, se prepararon fragmentos de ADN que codificaban AAT por medio del método de PCR, diseñando un oligonucleótido para que fuera una forma en la que se añadió un sitio de reconocimiento por endonucleasas de restricción que permite una fácil introducción en un vector de expresión.

Cebador de oligonucleótido

25 MMA-044: 5'-GTTTGCACGCCCTGCCGTTCGACG-3' (SEQ ID NO. 11)

MMA-045: 5'-CGGTACGCGCGGATCTTCCAGAG-3' (SEQ ID NO. 12)

Composición de la disolución de reacción

30 Agua esterilizada 22 µl

2 × PrimeSTAR (fabricado por Takara Bio) 25 µl

Cebador directo 1 µl

35 Cebador inverso 1 µl

ADN genómico 1 µl

40 Cantidad total 50 µl

Ciclo de temperatura

45 30 ciclos de reacción a 98 °C 10 segundos, 55 °C 15 segundos y 72 °C 150 segundos.

50 Se purificó una banda de producto de amplificación obtenido mediante el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN). Se digirió el ADN purificado respectivo con la enzima de restricción PstI (sitio de reconocimiento de escisión incluido en el cebador directo) y Sse8387I (sitio de reconocimiento de escisión incluido en el cebador inverso). Se realizó la separación mediante electroforesis en gel de agarosa, se cortó la banda diana del gel y se realizó la purificación. En la purificación, usando un kit de purificación de gel/PCR (fabricado por FAVORGEN), se eluyó con 30 ml de agua estéril.

55 Se mezclaron el ADN purificado (5 µl), vector pTrc99A digerido con NcoI y Sse8387I (1 µl), agua destilada (4 µl) y disolución I (kit de ligación de ADN ver. 2 (Takara Bio)) (10 µl), y se ligó el vector con el producto de amplificación de PCR incubando durante 12 horas a 16 °C.

60 A 200 µl de la célula competente preparada mediante el método del ejemplo de referencia 1, se le añadieron 10 µl de la disolución de ligación mencionada anteriormente y se dejó reposar a 0 °C durante 30 minutos, seguido por conferir choque térmico a 42 °C durante 30 segundos y enfriamiento hasta 0 °C durante 2 minutos, tras lo cual se añadió 1 ml de medio de cultivo SOC (glucosa 20 mM, Bacto-triptona al 2 %, extracto de levadura Bacto al 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgSO₄ 1 mM, MgCl₂ 1 mM) y se cultivó con agitación a 37 °C durante 1 hora.

65 Tras cultivar, se inocularon 100 µl de medio de cultivo en agar nutritivo LB Amp (medio de cultivo LB que contenía ampicilina 100 mg/l, agar al 1,5 %), y se cultivaron adicionalmente a 37 °C. Se cultivó una pluralidad de colonias transformantes hechas crecer sobre agar nutritivo durante la noche a 37 °C en 1,5 ml de medio de cultivo LB Amp

(medio de cultivo LB que contenía ampicilina 100 mg/l), y tras la cosecha, se preparó ADN de plásmido usando un kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN).

Para el ADN de plásmido respectivo recombinante obtenido, se confirmó la secuencia de nucleótidos del mismo usando un kit CEQ DTCS Quick Start y analizador de ADN CEQ 2000XL de secuenciador fluorescente (ambos de Beckman Coulter, EE. UU.), y se denominaron plásmido pAAT101 a pAAT103 (tabla 6).

Para los vectores pET16b, se introdujo el gen de AAT mediante operaciones similares, y se denominaron los plásmidos obtenidos pAAT201 a pAAT203 (tabla 6). Sin embargo, puesto que no existe el sitio Sse8387I en pET16b, se preparó de antemano uno en el que se había insertado un ligador que incluía la secuencia de escisión Sse8387I en el sitio BamHI de pET16b, y se usó este como vector.

Se introdujeron los plásmidos pAAT101 a pAAT103 en la cepa JM109 para obtener JM109 recombinante/pAAT101 a pAAT103. Se introdujeron los plásmidos pAAT201 a pAAT203 en la cepa BL21 (DE3) para obtener BL21 (DE3) recombinante/pAAT201 a pAAT203.

[Tabla 6]

Plásmido para la expresión del gen de AAT derivado de plantas

SEQ ID NO	Origen vegetal (nombre del gen)	Plásmido molde	Plásmido de expresión	
			pTrc99A	pET16b
2	Manzana (MpAAT1)	pAAT001	pAAT101	pAAT201
4	Fresa (SAAT)	pAAT002	pAAT102	pAAT202
6	Fresa (VAAT)	pAAT003	pAAT103	pAAT203

Ejemplo 7: Preparación de extracto libre de células a partir de *E. coli* recombinante que expresa el gen de AAT

(1) Cultivo de *E. coli* recombinante usando pTrc99A como vector

Se inocularon las *E. coli* recombinantes JM109/pAAT101 a pAAT103 obtenidas en el ejemplo 6 en 1 ml de un medio de cultivo LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina, y se realizó el precultivo a 37 °C durante 7 horas. Se tomó el caldo en 0,1 ml, se añadió a 100 ml del mismo medio de cultivo (ampicilina 100 µg/ml, MIPTG 1 mM contenido) y se cultivó con agitación a 37 °C durante 15 horas. Se recuperó la célula bacteriana por medio de centrifugación (3700 × g, 10 min, 4 °C) del caldo obtenido, y tras lavar con una disolución de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,0), se suspendió en la misma disolución de tampón. Se usó JM109/pTrc99A como cepa de referencia.

(2) Cultivo de *E. coli* recombinante usando pET16b como vector

Se inocularon las *E. coli* recombinantes BL21 (DE3)/pAAT201 a pAAT203 obtenidas en el ejemplo 6 en 1 ml de un medio de cultivo LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina, y se realizó el precultivo a 37 °C durante 14 horas. Se tomó el caldo en 0,1 ml, se añadió a 100 ml del mismo medio de cultivo (ampicilina 100 µg/ml), y tras cultivar con agitación a 37 °C hasta que la DO se hizo de 0,3, se añadió IPTG de modo que la concentración final se hizo de 1 mM y se cultivó adicionalmente con agitación durante varias horas. Se recuperó la célula bacteriana por medio de centrifugación (3700 × g, 10 min, 4 °C) del caldo obtenido, y tras lavar con una disolución de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,0), se suspendió para que tuviese una DO=6 (630 nm) en la misma disolución de tampón. Se usó BL21 (DE3)/pET16b como cepa de referencia.

(3) Preparación de extracto libre de células

Se preparó un extracto libre de células de la suspensión de células bacterianas obtenida. Usando un homogeneizador ultrasónico VP-15S (Taitec, Japón), se realizó la homogeneización durante 1 minuto al tiempo que se mantenía la suspensión de células bacterianas en hielo en condiciones de control de salida 4, CICLO DE TRABAJO del 40 %, PULSO, CRONÓMETRO = modo B 10 s. A continuación, se realizó la centrifugación (10 000 × g, 5 minutos, 4 °C), y se recogió 1 ml del sobrenadante obtenido (extracto libre de células).

Ejemplo 8: Síntesis de metacrilato de butilo usando extracto libre de células recombinante para el gen de AAT

Se realizó la siguiente reacción usando extracto libre de células preparado mediante el método descrito en el ejemplo 7. Se inició la reacción añadiendo 0,2 ml de extracto libre de células a una botella de muestra de 10 ml con un tapón (para CG) en la que se colocaron 0,8 ml de una disolución de metacrilil-CoA y alcohol de modo que la concentración final de la disolución de reacción era metacrilil-CoA 7 mM y n-butanol 40,5 mM. Se incubó la botella de muestra con un tapón a 30 °C durante de 1 a 5 horas para provocar la reacción.

Se analizó el gas en el espacio de cabeza de la botella de muestra con un tapón de manera similar al ejemplo 1. Los

resultados se muestran en la tabla 7.

[Tabla 7]

- 5 Formación de metacrilato de butilo usando recombinante para el gen AAT

Recombinante	Cantidad generada (mM)		
	1 hora	3 horas	5 horas
JM109/pAAT102	0,001	0,003	0,004
JM109/pAAT103	0	0,001	0,002
BL21 (DE3)/pAAT201	0,003	0,014	0,026
BL21 (DE3)/pET6b	0	0	0

Ejemplo 9A: Síntesis de éster del ácido metacrílico usando extracto libre de células recombinante para el gen de AAT

- 10 Se llevó a cabo la reacción de manera similar al ejemplo 8 usando metanol, etanol o n-butanol como alcohol, y usando el derivado de BL21 (DE3)/pAAT201 (manzana) en el extracto libre de células. Los resultados de análisis del producto tras 5 horas se muestran en la tabla 8.

15 [Tabla 8]

Generación de éster del ácido metacrílico usando recombinante para el gen de AAT

Recombinante	Cantidad generada tras 5 horas (mM)		
	Metacrilato de metilo	Metacrilato de etilo	Metacrilato de butilo
BL21 (DE3)/pAAT201	0,021	0,045	0,091

- 20 Ejemplo 9B: Síntesis 2 de éster del ácido metacrílico usando extracto libre de células recombinante para el gen de AAT

Usando isobutanol, butanol, alcohol bencílico o alcohol 2-etilhexílico, se llevó a cabo la siguiente reacción con el extracto libre de células de BL21 (DE3)/pAAT201 (manzana) obtenido en el ejemplo 7.

- 25 Se inició la reacción añadiendo 0,2 ml de extracto libre de células a una botella de muestra de 10 ml con un tapón (para CG) en la que se colocaron 0,8 ml de una disolución que contenía metacrilil-CoA y alcohol de modo que la concentración final de la disolución de reacción era metacrilil-CoA 1 mM y n-butanol 40 mM.

- 30 Se incubó la botella de muestra con un tapón a 30 °C durante de 1 a 5 horas para provocar la reacción. Tras la finalización de la reacción, se añadió 1 ml de acetonitrilo y se mezcló con la disolución de reacción en la botella de muestra con un tapón. Posteriormente, tras la filtración usando un filtro de jeringa DISMIC/tamaño de poro de 0,45 µm (fabricado por ADVANTEC), se proporcionó para el análisis de HPLC. Los resultados de análisis del producto tras 5 horas se muestran en la tabla 9.

- 35 Síntesis de ésteres del ácido metacrílico (metacrilato de isobutilo, metacrilato de fenilo, metacrilato de bencilo, metacrilato de 2-etilhexilo) usando recombinante para el gen de AAT

40 [Tabla 9]

Recombinante	Cantidad generada tras 5 horas (mM)			
	Metacrilato de isobutilo	Metacrilato de fenilo	Metacrilato de bencilo	Metacrilato de 2-ethylhexilo
BL21 (DE3)/pAAT201	0,009	0,001	0,17	0,31

Condiciones de análisis de HPLC

45 Dispositivo: Waters 2695

Columna: Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 5 µm

Fase móvil: MeOH al 65 %, ácido fosfórico al 0,2 %

- 50 Velocidad de flujo: 0,25 ml/min

Temperatura de la columna: 35 °C

Detección: UV 210 nm

Volumen de inyección: 10 µl

5 Ejemplo 10: Preparación de *E. coli* recombinante en la que se introdujo el gen de ACD

10 Preparación de recombinante de alta expresión con clonación de gen homólogo de ACD de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

10 (1) Preparación de ADN genómico de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

15 Se inoculó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (NBRC106052) hecha crecer en agar nutritivo LB (Bacto-triptona al 1 %, extracto de levadura Bacto al 0,5 %, NaCl al 0,5 %, agar al 1,5 %) en 10 ml de medio de cultivo líquido LB (Bacto-triptona al 1 %, extracto de levadura Bacto al 0,5 %, NaCl al 0,5 %), y se realizó cultivo con agitación a 37 °C durante 15 horas. Tras la finalización del cultivo, se recuperó la célula bacteriana por medio de centrífuga a partir de 2 ml del caldo, y se prepararon 100 ml de ADN genómico usando el kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega KK).

20 (2) Clonación del vector de expresión

25 El ADN genómico obtenido se convirtió en un molde, y se preparó un fragmento de ADN que incluía un gen que se suponía que codificaba ACD por medio del método de PCR para que fuera una forma en la que se añadió un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción que permite una fácil introducción en un vector de expresión.

25 Cebador de oligonucleótido

30 MMA-003: 5'-GACCCATGGATTCGACCTCACCGAAGAAC-3' (SEQ ID NO. 13)

30 MMA-004: 5'-GCCCTGCAGGATGCGATGGTCGCGGGCGTTC-3'(SEQ ID NO. 14)

Composición de la disolución de reacción

35 Agua esterilizada 22 µl

35 2 × PrimeSTAR (fabricado por Takara Bio) 25 µl

40 MMA-003 (SEQ ID NO. 13) 1 µl

40 MMA-004 (SEQ ID NO. 14) 1 µl

45 ADN genómico 1 µl

45 Cantidad total 50 µl

45 Ciclo de temperatura

50 30 ciclos de reacción a 98 °C 10 segundos, 55 °C 15 segundos y 72 °C 150 segundos

50 Se purificó una banda de aproximadamente 1,2 kb del producto de amplificación obtenido mediante un kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN). Se digirió el ADN purificado con la enzima de restricción Ncol (sitio de reconocimiento de escisión incluido en el oligonucleótido MMA-003) y Sse8387I (sitio de reconocimiento de escisión incluido en el oligonucleótido MMA-004), y se purificó por medio de extracción con fenol/extracción con cloroformo/precipitación con etanol. Se mezclaron el ADN purificado (5 µl), vector pTrc99A digerido con Ncol y Sse8387I (1 µl), agua destilada (4 µl) y disolución I (kit de ligación de ADN ver. 2 (Takara Bio)) (10 µl), y se ligó el vector con producto de amplificación de PCR mediante incubación durante 12 horas a 16 °C.

60 A 200 µl de la célula competente preparada mediante el método del ejemplo de referencia 1, se le añadieron 10 µl de la disolución de ligación mencionada anteriormente y se dejó reposar a 0 °C durante 30 minutos, seguido por conferir choque térmico a 42 °C durante 30 segundos y enfriamiento hasta 0 °C durante 2 minutos, tras lo cual se añadió 1 ml de medio de cultivo SOC (glucosa 20 mM, Bacto-triptona al 2 %, extracto de levadura Bacto al 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgSO₄ 1 mM, MgCl₂ 1 mM) y se cultivó con agitación a 37 °C durante 1 hora.

65 Tras cultivar, se inocularon 200 µl de medios de cultivo en agar nutritivo LB Amp (medio de cultivo LB que contenía ampicilina 100 mg/l, agar al 1,5 %), y se cultivó adicionalmente a 37 °C. Se cultivó una pluralidad de colonias de

organismos transgénicos cultivados sobre agar nutritivo durante la noche a 37 °C en 1,5 ml de medio de cultivo LB Amp (medio de cultivo LB que contenía ampicilina 100 mg/l), y tras la cosecha, se recuperó ADN de plásmido usando un instrumento Flexi Prep (fabricado por Amersham Biosciences).

5 (3) Transformación

Para el ADN de plásmido recombinante obtenido, se confirmó la secuencia de nucleótidos del mismo usando un kit CEQ DTCS Quick Start y analizador de ADN CEQ 2000XL de secuenciador fluorescente (ambos de Beckman Coulter, EE. UU.), y se denominó plásmido pMMA002. Se transformó la cepa de *E. coli* JM109 usando el plásmido pMMA002 para preparar un recombinante en el que se había introducido el gen de ACD (SEQ ID NO. 8). La secuencia de aminoácidos se muestra mediante SEQ ID NO. 7.

Ejemplo 11: Preparación de extracto libre de células a partir de *E. coli* recombinante que expresa el gen de ACD

15 Se inoculó *E. coli* JM109/pMMA002 recombinante en la que se había introducido el gen de ACD (SEQ ID NO. 8) obtenido en el ejemplo 10 en 1 ml de un medio de cultivo LB que contenía ampicilina 100 µg/ml, y se realizó el precultivo a 37 °C durante 7 horas. Se tomó el caldo en 0,1 ml, se añadió a 100 ml del mismo medio de cultivo (ampicilina 100 µg/ml, IPTG 1 m contenido) y se cultivó con agitación a 37 °C durante 15 horas. Se recuperó la célula bacteriana por medio de centrifugación (3700 × g, 10 min, 4 °C) del caldo obtenido, y tras lavar con una disolución de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,0), se suspendió para que tuviese una DO=6 (630 nm) en la misma disolución de tampón. Se usó JM109/pTrc99A como cepa de referencia.

25 A partir de la suspensión de células bacterianas obtenida, se preparó 1 ml de extracto libre de células tal como sigue. Usando un homogeneizador ultrasónico VP-15S (Taitec, Japón), se realizó la homogeneización durante 1 minuto mientras se mantenía en hielo en condiciones de control de salida 4, CICLO DE TRABAJO DEL 40 %, CRONÓMETRO DE PULSO = modo B 10 s. A continuación, se realizó la centrifugación (10 000 × g, 5 minutos, 4 °C), y se recogió el sobrenadante obtenido como extracto libre de células.

30 Ejemplo 12: Preparación de metacrilato de butilo a partir de isobutiril-CoA usando fragmento vegetal y extracto libre de células recombinantes modificada genéticamente para ACD

(1) Reacción de síntesis de metacrilil-CoA con isobutiril-CoA como sustrato mediante extracto libre de células recombinantes modificadas genéticamente para ACD

35 A 1,84 ml de una disolución que contenía metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio 6 mM, flavina adenina dinucleótido 0,4 mM e isobutiril-CoA 1 mM en una disolución de tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 8,0), se añadieron 0,16 ml de extracto libre de células que tenía actividad de ACD obtenido en el ejemplo 10 para preparar 2 ml de disolución de reacción. Se permitió que reaccionaran a 37 °C durante 30 minutos, y se realizó el análisis en las condiciones de HPLC mostradas a continuación. Como resultado de los mismos, el pico de isobutiril-CoA desapareció, confirmando de ese modo la formación de metacrilil-CoA.

40 Condiciones de análisis de HPLC

Columna: Inertsil ODS-3V, 4,6 mm × 250 mm

45 Fase móvil: MeOH al 30 %, H₃PO₄ 50 mM, pH 5,7

Velocidad de flujo: 1,0 ml/min

50 Temperatura de la columna: 35 °C

Detección: UV 254 nm

Volumen de inyección: 10 µl

55 Se diluyó la disolución de reacción 10 veces con fase móvil y se midió.

(2) Síntesis de metacrilato de butilo mediante la adición de alcohol n-butílico y fragmento vegetal a disolución de reacción de síntesis de metacrilil-CoA

60 Se retiró la piel de un plátano, se cortó el sarcocarpio con una cuchilla hasta un grosor de aproximadamente 1 milímetro, y se dividió esto adicionalmente en cuatro. A un matraz de 50 ml, se le añadieron 1 g del plátano cortado, 0,9 ml de la disolución de reacción de síntesis de metacrilil-CoA, 0,1 ml de disolución de KCl 3,5 M y 5 ml de alcohol n-butílico, se selló y entonces se permitió que reaccionaran a 30 °C durante 2 horas. Tras realizar análisis del éster del ácido metacrílico de manera similar al ejemplo 1, se formaron 0,015 mM de metacrilato de butilo.

Ejemplo 13: Preparación de *E. coli* recombinante en la que se introdujo el gen de ECH

(1) Preparación de ADN genómico de *Rhodococcus bacterium*

5 Se inoculó la cepa de *Rhodococcus erythropolis* PR4 (NBRC100887) en medio de cultivo de agar nutritivo LB en 10 ml de medio de cultivo LB, y se realizó cultivo con agitación a 30 °C durante 36 horas. Tras la finalización del cultivo, se recuperó la célula bacteriana por medio de centrifugado a partir de 2 ml del caldo, y se adquirieron 100 µl de ADN genómico de manera similar al ejemplo 10.

10 (2) Clonación del vector de expresión

El ADN genómico obtenido se convirtió en un molde, y se preparó un fragmento de ADN que incluía un gen de secuencia de nucleótidos que se suponía que codificaba ECH por medio del método de PCR para que fuera una forma en la que se añadió un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción que permite una fácil introducción en un vector de expresión.

Cebador de oligonucleótido:

20 MMA-031: 5'-GGTCATGACCGACTTCAACACCATCATCCTC-3' (SEQ ID NO. 15)

MMA-032: 5'-GGCCTGCAGGTTCAGCTGTTGAAAGTTCAGCGC-3' (SEQ ID NO. 16)

Se realizó PCR de manera similar al ejemplo 10, y se digirió el ADN obtenido con la enzima de restricción BspHI (sitio de reconocimiento de escisión incluido en el oligonucleótido MMA-031) y Sse8387I (sitio de reconocimiento de escisión incluido en el oligonucleótido MMA-032). Tras la escisión, se realizaron las mismas operaciones que en el ejemplo 6 para adquirir el ADN de plásmido diana en el que se incorporó el gen de ECH (SEQ ID NO. 10), y entonces se denominó plásmido pMMA011. La secuencia de aminoácidos se muestra mediante SEQ ID NO. 9.

25 (3) Transformación

30 Se transformó la cepa de *E. coli* JM109 usando el plásmido pMMA011 para preparar *E. coli* recombinante para la expresión del gen de ECH.

Ejemplo 14: Síntesis de metacrilato de butilo a partir de 3-hidroxiisobutiril-CoA usando extracto libre de células de *E. coli* recombinantes para la expresión del gen de ECH y extracto libre de células recombinantes para el gen de AAT

35 (1) Preparación de líquido con células rotas que tiene actividad de ECH

40 Se inoculó la *E. coli* JM109/pMA011 recombinante en la que se había introducido el gen de ECH obtenido en el ejemplo 13 en un medio de cultivo LB que contenía 2 ml de ampicilina 100 µg/ml, y se realizó el precultivo a 37 °C durante 24 horas. Se tomó el caldo en 0,1 ml, se añadió a 100 ml del mismo medio de cultivo (ampicilina 100 µg/ml, MIPTG 1 m contenido), y se cultivó con agitación a 37 °C durante 15 horas. Se recuperó la célula bacteriana por medio de centrifugación (3700 × g, 10 min, 4 °C) del caldo obtenido, y tras lavar dos veces con una disolución de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,0), se diluyó para que tuviese una DO=6 (630 nm) en la misma disolución de tampón.

45 A partir de la suspensión de células bacterianas obtenida, se preparó 1 ml de líquido con células rotas del siguiente modo. Usando un homogeneizador ultrasónico Sonifier 250D (Branson, EE. UU.), se homogeneizó durante 5 minutos mientras se mantenía en hielo en condiciones de amplitud: 15 %/encendido: 1 s, apagado: 1 s.

50 (2) Reacción de síntesis de metacrilil-CoA usando líquido con células rotas de *E. coli* recombinante para la expresión del gen de ECH

55 A la mezcla preparada mezclando 0,2 ml de disolución de tampón tris-HCl 0,5 M (pH 7,4), 0,4 ml de disolución acuosa de 3-hidroxiisobutiril-CoA 1,2 mM y 1,2 ml de agua, se le añadieron 0,2 ml de líquido con células rotas que tenía actividad enoil-CoA hidratasa obtenido del modo anterior para preparar 2 ml de disolución de reacción. Se permitió que reaccionara a 37 °C durante 30 minutos, y se realizó el análisis en las condiciones de HPLC mostradas en el ejemplo 12. Como resultado del mismo, se confirmó la formación de metacrilil-CoA.

60 (3) Síntesis de metacrilato de butilo usando extracto libre de células recombinante para el gen de AAT

65 A una botella de muestra de 10 ml, se le añadieron 0,4 ml de la disolución de reacción de síntesis de metacrilil-CoA, 0,1 ml de disolución de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,5) y 0,2 ml de agua, se le añadieron adicionalmente 0,1 ml de disolución de n-butanol 0,4 M y 0,2 ml de líquido con células rotas con AAT de manzana (MpAAT) preparado de manera similar al ejemplo 7, se selló y entonces se permitió que reaccionaran a 30 °C durante 3 horas.

Tras realizar análisis de éster del ácido metacrílico de manera similar al ejemplo 1, se formaron 0,001 mM de metacrilato de butilo.

Ejemplo 15: Preparación de recombinante de alta expresión con clonación del gen de BCKAD, preparación de extracto libre de células y análisis de expresión de proteína

- 5 La preparación de plásmido de expresión con clonación génica y la preparación de recombinante se realizaron de manera similar al ejemplo 10. Se convirtió ADN genómico de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en un molde, y se preparó un fragmento de ADN que incluía todo el operón génico que codifica el gen del complejo BCKAD por medio del método de PCR usando el cebador mostrado a continuación. Se digirió el fragmento obtenido mediante la enzima de restricción BspHI y Sse8387I, y se insertó en el vector pTrc99A de manera similar al ejemplo 10 para obtener el plásmido recombinante (pWA108).

Cebadores de oligonucleótido:

MAA-15: 5'-GGCCTGTCATGAGTGATTACGAGCCG-3' (SEQ ID NO. 17)

15 MAA-16: 5'-CGGCCCTGCAGGTCGCGGGAAATCAGATGTGC-3' (SEQ ID NO. 18)

Se cultivó la *E. coli* JM109/pWA108 recombinante obtenida del modo anterior de manera similar al ejemplo 10. Sin embargo, en el caso del presente recombinante, puesto que se reconoció una alta expresión de proteína incluso sin realizar la adición de IPTG basándose en los resultados preliminares, se realizó sin la adición de IPTG. Se realizó la preparación de extracto libre de células de manera similar al ejemplo 11.

Ejemplo 16: Medición de la actividad del extracto libre de células de recombinante de alta expresión del gen de BCKAD

25 Se midió la actividad de BCKAD a partir de la generación de isobutiril-CoA con ácido 2-oxoisovalérico como sustrato del siguiente modo.

30 A 0,7 ml de una disolución que contenía concentraciones finales de MgCl₂ 1 mM, pirofosfato de tiamina 0,2 mM, CoA-Sh 1 mM y DDT 2 mM en una disolución de tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 7,0), se le añadieron 0,2 ml del extracto libre de células obtenido en el ejemplo 15 para constituir 0,9 ml. Tras añadir 0,1 ml (concentración final de 4 mM) de sal de calcio de ácido 2-oxoisovalérico a esto y hacer reaccionar a 37 °C durante 30 minutos, se realizó ultrafiltración usando un instrumento Centricut Super Mini W-10 (Kurabo Industries Ltd.). Se detuvo la reacción realizando desproteinización, y se realizó el análisis mediante HPLC en las siguientes condiciones. Como resultado de lo mismo, se reconoció la formación de isobutiril-CoA 0,83 mM con JM109/pWA108.

Condiciones de análisis de HPLC

Columna: Inertsil ODS-3V, 4,6 mm × 250 mm

40 Fase móvil: MeOH al 35 %, H₃PO₄ 50 mM, pH 5,7

Velocidad de flujo: 1,0 ml/min

45 Temperatura de la columna: 35 °C

Detección: UV 254 nm (210 nm)

Volumen de inyección: 10 µl (disolución de reacción diluida 10 veces con fase móvil y medida)

50 Ejemplo 17: Síntesis de metacrilil-CoA (figura 1) a partir de ácido 2-oxoisovalérico mediante mezcla de extracto libre de células de recombinante de alta expresión del gen de BCKAD y recombinante que expresa el gen de ACD

55 A 0,6 ml de una disolución que contenía concentraciones finales de MgCl₂ 1 mM, pirofosfato de tiamina 0,2 mM, CoA-SH 1 mM, DDT 2 mM, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) 2 mM, flavina adenina dinucleótido (FAD) 0,04 mM y valina 2 mM en una disolución de tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 7,0), se le añadieron 0,1 ml de cada uno de los extractos libres de células (JM109/pMMA002 y JM109/pWA108) obtenidos mediante los métodos del ejemplo 11 y ejemplo 15 respectivamente para constituir 0,8 ml. Tras añadir 0,1 ml de sal de calcio de ácido 2-oxoisovalérico (concentración final de 4 mM) a esto y hacer reaccionar a 37 °C durante 30 minutos, se confirmó la formación de isobutiril-CoA mediante HPLC, y se añadió 0,1 ml de metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio (concentración final de 6 mM) y se permitió que reaccionaran adicionalmente durante 3 horas. Tras la reacción, se realizó ultrafiltración usando un instrumento Centricut Super Mini W-10 (Kurabo Industries Ltd.). Se detuvo la reacción realizando desproteinización, y se realizó el análisis mediante HPLC. Como resultado de lo mismo, se reconoció la formación de metacrilil-CoA 0,2 mM.

65 Ejemplo de referencia 2: Preparación de PR4KS receptora de transferencia por conjugación

5 Se modificó *Rhodococcus erythropolis* PR4 (NITE Biological Resource Center; número de depósito: NBRC 100887) mediante el método descrito en la solicitud de patente japonesa no examinada, publicación n.º 2011-200133 para preparar un derivado que presenta resistencia a cloranfenicol 120 mg/l y que carece de gen resistente a kanamicina, y se denominó cepa PR4KS.

10 10 Más específicamente, con el fin de potenciar la resistencia a cloranfenicol, se elevó gradualmente la concentración de cloranfenicol en un medio de cultivo MYK (polipeptona al 0,5 %, extracto de bact.-levaduras al 0,3 %, extracto de malta al 0,3 %, KH₂PO₄ al 0,2 %, K₂HPO₄ al 0,2 %) por etapas partiendo de 10 mg/ml hasta 120 mg/ml, mientras se inducía la mutación espontánea subcultivando la cepa PR4, obteniendo de ese modo la cepa RhCmSR-09 derivada que tenía resistencia a 120 mg/ml de cloranfenicol.

15 15 A continuación, se mezcló la cepa RhCmSR-09 mencionada anteriormente a una razón 1:1 con *E. coli* que retenía el plásmido pKM043 para la introducción de deficiencia de gen resistente a kanamicina descrita en la solicitud de patente japonesa no examinada, publicación n.º 2011-200133, luego se cultivó, y tras introducir pKM043 en la cepa RhCmSR-09 mediante transferencia por conjugación, se cultivó en agar nutritivo MYK que contenía sulfato de kanamicina 200 mg/l y cloranfenicol 50 mg/l (polipeptona al 0,5 %, extracto de bact.-levaduras al 0,3 %, extracto de malta al 0,3 %, KH₂PO₄ al 0,2 %, K₂HPO₄ al 0,2 %, agar al 1,5 %), obteniendo de ese modo una cepa recombinante homóloga en la que se había introducido pKM043 en el genoma de la cepa RhCmSR-09. Se cultivó la cepa recombinante homóloga en agar nutritivo MYK que contenía sacarosa al 10 %, mediante lo cual se obtuvo una cepa derivada que surgía como cepa sensible a kanamicina entre las colonias obtenidas, es decir cepa PR4KS derivada con variación de deficiencia de gen resistente a kanamicina.

20 20 Ejemplo de referencia 3: Preparación de plásmido para deficiencia génica con clonación del gen homólogo de LigD

25 25 Se estableció el gen homólogo de LigD (n.º de registro: YP_002767969) de la cepa PR4KS como gen diana. Tras la amplificación de aproximadamente 5,4 kb de ADN que incluía la secuencia que rodeaba al gen homólogo de LigD por medio de PCR, se clonó en el vector de plásmido pK19mobsacB1 en el que se había introducido el gen de sacB en el sentido de 3' y en la misma orientación del gen resistente a kanamicina, descrito en la solicitud de patente japonesa no examinada, publicación n.º 2011-200133, obteniendo de ese modo el plásmido pTJ001. Las condiciones de PCR fueron las siguientes.

Cebadores

30 35 GB-138: 5'-GGCCTGCAGGTACCGATCATACCATCGGTGTC-3' (SEQ ID NO. 19)

GB-139: 5'-GGTCTAGACTGAGCAGTGTTCCAATGCG-3' (SEQ ID NO. 20)

Composición de la disolución de reacción

40 40 Agua esterilizada 22 µl

2 × PrimeSTAR (fabricado por Takara Bio) 25 µl

45 45 GB-138 (SEQ ID NO. 19) 1 µl

GB-139 (SEQ ID NO. 20) 1 µl

50 50 Genoma de PR4KS (50 ng/µl) 1 µl

Cantidad total 50 µl

Ciclo de temperatura

55 55 35 ciclos de reacción a 98 °C 10 segundos, 55 °C 15 segundos y 72 °C 120 segundos

60 60 Se preparó el plásmido para pTJ002 con deficiencia de gen homólogo de LigD en el que se delecionó la longitud completa de la secuencia homóloga de LigD dentro de pTJ001 (aproximadamente 2,3 kb) y solo se permitió que permanecieran las secuencias en el sentido de 5' y en el sentido de 3' del gen homólogo de LigD (se remite a la figura 3). Se amplificó la secuencia dentro de pTJ001 usando los cebadores GB-140 y GB-141, que incluyen la secuencia circundante del codón de iniciación y la secuencia circundante del codón de terminación del gen homólogo de LigD seleccionado como diana, respectivamente, y que se diseñaron para que se extendieran en la dirección en sentido de 5' del codón de iniciación y en la dirección en el sentido de 3' del codón de terminación, respectivamente, con el fin de obtener el producto de PCR que no incluye el gen homólogo de LigD. Se transformó la cepa de *E. coli* JM109 mediante el producto de PCR obtenido para preparar ADN circular como pTJ002. Las

condiciones de PCR son tal como sigue.

Cebadores

5 GB-140: GAGGAAATGGTCACAGGGCGAGAATAGGTTG (SEQ ID NO. 21)

GB-141: GCCCTGTGACCATTCCTCATTGTGCTGG (SEQ ID NO. 22)

10 Composición de la disolución de reacción

10 Agua esterilizada 22 µl

2 × PrimeSTAR (fabricado por Takara Bio) 25 µl

15 GB-140 (SEQ ID NO. 21) 1 µl

GB-141 (SEQ ID NO. 22) 1 µl

20 pTJ001 1 µl

20 Cantidad total 50 µl

Ciclo de temperatura

25 30 ciclos de reacción a 98 °C 10 segundos, 50 °C 10 segundos y 72 °C 180 segundos

Tras la finalización de la PCR, tras la realización de la confirmación del fragmento mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % usando 1 µl de muestra, se reconoció la amplificación del fragmento. En el procedimiento de producción de plásmido pTJ002 mencionado anteriormente, se usó un kit de purificación de ADN genómico Wizard (fabricado por Promega) en la extracción del genoma de la cepa PR4, se usó un kit de purificación de gel/PCR (fabricado por FAVORGEN) en la purificación del fragmento de ADN digerido con la enzima de restricción y el producto de PCR, se usó un kit de ligación de ADN <Mighty Mix> (fabricado por Takara Bio) en la unión de ADN y se usó un kit QIAprep miniprep (fabricado por QIAGEN) en la extracción del plásmido.

35 Ejemplo de referencia 4: Preparación de cepa de PR4KS derivada deficiente en gen homólogo de LigD

Con el producto mediante la transformación de *E. coli* (*Escherichia coli*) S17-1λpir por medio de pTJ002 como donador, y la PR4KS obtenida mediante el método del ejemplo de referencia 2 como receptor, se realizó transferencia por conjugación de manera similar al método descrito en la solicitud de patente japonesa no examinada, publicación n.º 2011-200133 para obtener 13 cepas de la cepa derivada deficiente en gen homólogo de LigD producida mediante recombinación homóloga. Se seleccionó una cepa de las cepas derivadas deficientes, y se denominó PR4KSΔligD.

40 Ejemplo de referencia 5: Preparación del plásmido pLK005 para *Rhodococcus bacterium* y plásmido pSJ201 de expresión de nitrilo hidratasa usando el mismo

45 (1) Adquisición y análisis de pLK005

50 Usando pK4 (se remite a la solicitud de patente japonesa no examinada, publicación n.º H5-64589), se transformó *Rhodococcus sp* N775 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Patent Organism Depository, número de depósito FERM BP-961) mediante el método de electroporación mencionado anteriormente. Se inoculó el transformante obtenido en 10 ml de medio de cultivo MYK, y se cultivó a 30 °C durante 1 día. Se realizó un tratamiento de variación exponiendo esto a luz ultravioleta en una mesa de laboratorio limpia. Se aplicó el líquido de cultivo en el que se realizó el tratamiento de variación a agar nutriente MYK que contenía kanamicina de 50 a 400 µg/ml, y se cultivó a 30 °C durante 3 días.

55 Se cultivó respectivamente la pluralidad de colonias que aparecen sobre el agar nutriente en medio de cultivo MYK, y se recuperaron los plásmidos de los transformantes. Usando el plásmido recuperado, se transformó de nuevo *Rhodococcus sp* N775, y se investigó si la resistencia a la kanamicina del transformante mejora. Como resultado de lo mismo, se reconocieron varias cepas de transformante para las que la resistencia a la kanamicina mejoró claramente.

60 Tras investigar las secuencias de nucleótidos de plásmidos para los que se reconoció que la resistencia a la kanamicina mejoraba, se reconoció que se produce un cambio en la secuencia en la región en el sentido de 5' del gen resistente a kanamicina de pK4 (solapamiento de secuencia de 8 nucleótidos GTTGTAGG). Este plásmido para

el que se reconoció que mejoraba esta resistencia a la kanamicina se denominó pLK005.

(2) Preparación de pSJ040

5 El plásmido pSJ034 es un plásmido preparado a partir del plásmido pSJ023 mediante el método descrito en la solicitud de patente japonesa no examinada, publicación n.º H10-337185. En pSJ034, aunque están presentes tres sitios de enzimas de restricción EcoRI, se preparó el plásmido pSJ040 en el que uno de estos se transformó en un sitio Spel. Específicamente, se descompuso parcialmente pSJ034 usando la enzima de restricción EcoRI. Se convirtió el sitio escindido en extremo romo usando el kit Blunting de Takara y luego se realizó una reacción de ligación en presencia del ligador Spel. Se transformó la cepa de *E. coli* JM109 usando la disolución de reacción. Tras cultivar el transformante, se extrajo el plásmido, y se separó el plásmido en el que se había insertado el ligador Spel. El plásmido en el que se insertó el ligador Spel, entre los tres sitios EcoRI de pSJ034, en el sitio EcoRI presente en el sentido de 3' del gen resistente a kanamicina, se denominó pSJ040.

15 (3) Ensamblaje de pSJ201

Se digirió pLK005 con HindIII para preparar un fragmento de aproximadamente 2,1 kb. Por otro lado, se digirió pSJ040 con HindIII para preparar un fragmento de aproximadamente 9,8 kb. Usando estos dos fragmentos, se realizó la reacción de ligación, y se transformó la cepa de *E. coli* JM109 usando la disolución de reacción. Tras cultivar el transformante, se extrajo el plásmido y se confirmó la secuencia de nucleótidos del mismo, como resultado de lo cual un plásmido que mantenía la secuencia mutada (duplicación de GTTGTAGG) derivada de pLK005, y que tenía por lo demás la misma secuencia que pSJ040, se denominó pSJ201.

25 Ejemplo de referencia 6: Preparación de la cepa derivada deficiente en el gen de RE_acd1/RE_echA/RE_hchA/RE_mmsB de la cepa derivada PR4KS Δ ligD

(1) Preparación del plásmido para la deficiencia génica usando el método In Fusion

30 Se realizó la preparación de un plásmido para deficiencia génica por medio de un kit de clonación In-Fusion HD (fabricado por Takara Bio) en el que el gen de RE_acd1/RE_echA/RE_hchA/RE_mmsB de la cepa PR4KS era el gen diana (se remite a la figura 4).

35 El ADN de las secuencias en el sentido de 5' y en el sentido de 3' del gen diana se amplificó mediante PCR. Las condiciones de PCR fueron tal como sigue.

Cebadores para el fragmento 1

MMA-061: CGACTCTAGAGGATCGCTCAGTACATCTACGAGAC (SEQ ID NO. 23)

40 MMA-062: AGTGTGAGGAAAGTGTCCGATCAGTTCAT (SEQ ID NO. 24)

Cebadores para el fragmento 2

MMA-063: CACTTCCTCACACTCGTCGAGAGTATGAG (SEQ ID NO. 25)

45 MMA-064: CGGTACCCGGGGATCAGCGCGACGAACAAACGAGAC (SEQ ID NO. 26)

Composición de la disolución de reacción

50 Molde (ADN genómico de tipo natural de PR4) 1 μ l

2 \times premezcla PrimeSTAR Max (fabricado por Takara Bio) 25 μ l

Cebador Fw (20 μ M) 1 μ l

55 Cebador Rv (20 μ M) 1 μ l

Aqua desionizada 22 μ l

60 Cantidad total 50 μ l

Ciclo de temperatura

65 30 ciclos de reacción a 98 °C 10 segundos, 60 °C 10 segundos y 72 °C 120 segundos

Tras la finalización de la PCR, tras realizar la confirmación del fragmento mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % usando 1 µl de muestra, se reconoció la amplificación del fragmento. Usando un kit de extracción de gel/PCR (fabricado por FAVORGEN), se realizó la sustitución del tampón en el producto de PCR (fragmento 1 y fragmento 2), y se usó en la reacción mediante el kit de clonación In-Fusion HD mostrado a continuación.

- 5 (2) Unión del fragmento diana con el vector mediante el kit de clonación In-Fusion HD y transformación
Se realizó la unión del fragmento y el vector mencionados anteriormente usando el kit de clonación In-Fusion HD. Las condiciones de reacción fueron tal como sigue.
- 10 Composición de la disolución de reacción
5 × premezcla de enzima In-Fusion HD 2 µl
- 15 Fragmento de vector 1,5 µl
Fragmento de ADN 1 1 µl
Fragmento de ADN 2 2 µl
- 20 Agua desionizada 3,5 µl
Cantidad total 10 µl
- 25 Tras incubar la disolución de reacción mencionada anteriormente a 50 °C durante 15 minutos, se enfrió en hielo, y se usó en la transformación de la cepa de *E. coli* JM109. Se realizó la selección de transformante de *E. coli* con agar nutritivo LB que contenía sulfato de kanamicina 50 mg/l (a continuación en el presente documento, agar nutritivo LB Km 50). Se preparó el plásmido a partir del transformante obtenido usando un kit Mini prep (QIAGEN) para obtener el plásmido diana. Se realizó la confirmación del plásmido investigando el tamaño de fragmento tras el tratamiento con la enzima de restricción XbaI, y la secuencia de la región de unión del fragmento de inserto y vector. El plásmido diana se denominó pMMA302.
- 30 (3) Preparación de cepa derivada recombinante homóloga de la cepa derivada PR4KSΔligD y cepa derivada deficiente en el gen
- 35 A 20 µl de la célula competente de la cepa PR4KSΔligD, se le añadieron 1 µl de pMMA302, y se incubó en hielo durante 10 minutos. Se desplazó toda la cantidad de la disolución incubada mencionada anteriormente a una cubeta de electroporación enfriada con hielo (0,1 cm), se aplicó un alto voltaje de 1,5 kV (200 Ω), se añadieron inmediatamente 600 µl de medio de cultivo líquido LB y se dejó reposar a 30 °C durante 6 horas. En el agar nutritivo LB que contenía sulfato de kanamicina 10 mg/l (a continuación en el presente documento, agar nutritivo LB Km 10), se propagaron 200 µl y se cultivaron a 30 °C durante 4 días. Se sembró en estrías la colonia hecha crecer sobre el agar nutritivo LB Km10, y tras cultivar durante 4 días, se realizó PCR de la colonia según las condiciones mostradas a continuación y se realizó la confirmación de la cepa derivada recombinante homóloga.
- 40 45 Cebadores
MMA-069: GCGCATCTACAAGGAAGAGATC (SEQ ID NO. 27)
MMA-070: GCGACGCTCATCGAGATCTC (SEQ ID NO. 28)
- 50 Composición de la disolución de reacción
Molde 4,0 µl
- 55 2 × tampón Mighty Amp (fabricado por Takara) 5,0 µl
Cebador Fw (20 µm) 0,25 µl
Cebador Rv (20 µm) 0,25 µl
- 60 Agua desionizada 0,3 µl
ADN polimerasa Mighty Amp (fabricado por Takara) 0,2 µl
- 65 Total 10,0 µl

- Ciclo de temperatura
- 30 ciclos de reacción a 98 °C 10 segundos, y 68 °C 180 segundos
- 5 La colonia que se reconoció que era una cepa derivada recombinante homóloga se suspendió en 200 µl de medio de cultivo LB, se propagaron 100 µl sobre agar nutriente LB + sacarosa al 10 % y se cultivó durante 3 días. A partir de las colonias hechas crecer, se seleccionaron las que se volvieron sensibles a kanamicina, y se confirmó la deficiencia del gen diana para estas mediante PCR de colonia. Como resultado de lo mismo, se obtuvo una cepa en la que los cuatro genes de RE_acdl, RE_echA, RE_hchA y RE_mmsB se habían delecionado de la cepa derivada PR4KSΔligD, y se denominó cepa DMA008.
- Ejemplo 18: Preparación de plásmido para la coexpresión de ACD y AAT en microorganismo que pertenece al género *Rhodococcus*
- 10 Se preparó un plásmido para expresar ACD y/o AAT en microorganismos que pertenecen al género *Rhodococcus*.
- 15 Se insertó un fragmento de “promotor de nitrilasa + gen de MpAAT1” obtenido mediante reacción PCR con el plásmido pAAT301 para la expresión génica de MpAAT1 como molde en el sentido de 3’ del gen de RE_acd1 del plásmido pMMA401 para la expresión génica de RE_acd1.
- 20 Se realizó la amplificación del fragmento de “promotor de nitrilasa + gen de MpAAT1” tal como sigue.
- 25 Cebadores
- 25 MMA-133 (Sse-ProFw): TGACCTGCAGGTGCACTCCGCTGCGACATGTATCGA (SEQ ID NO. 29)
- 25 MMA-131 (Sse-001Rv): ACTCTAGCCTGCAGGTCATTGACTAGTTGATCTAAGGTTTACA (SEQ ID NO. 30)
- 30 Composición de la reacción PCR
- Molde (pAAT301) 1 µl
- 35 2 × premezcla PrimeSTAR Max (fabricado por Takara) 10 µl
- 35 Cebador Fw (10 µM) 0,6 µl
- 35 Cebador Rv (10 µM) 0,6 µl
- 40 Agua desionizada 7,8 µl
- Total 20 µl
- 45 Ciclo de temperatura
- 45 30 ciclos de reacción a 98 °C 5 segundos, 60 °C 5 segundos y 72 °C 45 segundos
- 50 El fragmento de “promotor de nitrilasa + gen de MpAAT1” obtenido de este modo se trató con la enzima de restricción Sse8387I. Por otro lado, tras el tratamiento con Sse8387I, se realizó el tratamiento con SAP también sobre pMMA401. Se purificaron estos fragmentos de ADN usando un kit de purificación de gel/PCR (fabricado por FAVORGEN) tras realizar electroforesis en gel de agarosa 0,7 %. Las condiciones de reacción del tratamiento con enzimas de restricción y las condiciones de ligación fueron tal como sigue.
- 55 Composición de reacción del tratamiento con enzimas de restricción (fragmento de AAT)
- 55 Fragmento amplificado por PCR 40 µl
- 55 10xM tampón 5 µl
- 60 BSA al 0,1 % 4 µl
- 60 Sse8387I (fabricado por Takara) 1 µl
- 65 Total 50 µl

Composición de reacción del tratamiento con enzimas de restricción (fragmento de vector)

pMMA401 (vector) 3 μ l

5 10xM tampón 4 μ l

BSA al 0,1 % 4 μ l

10 AP 1 μ l

10 Sse8387I (fabricado por Promega) 1 μ l

Agua desionizada 27 μ l

15 Total 40 μ l

Composición de la reacción de ligación

20 pMMA401 1 μ l

20 Fragmento de inserto 2 μ l

Mezcla de ligación (fabricado por Takara) 3 μ l

25 Total 6 μ l

30 Se realizó la transformación de la cepa de *E. coli* JM109 usando una disolución de reacción de ligación mezclada en la composición mencionada anteriormente. Se extrajo el plásmido del transformante obtenido. Tras el tratamiento con la enzima de restricción Sse8387I, se realizó electroforesis en agarosa, y se confirmó que estaba insertándose un fragmento del tamaño diana. Se confirmó que era el plásmido diana a partir del análisis de la secuencia de nucleótidos de la región de unión del fragmento de inserto del plásmido obtenido, y se denominó el presente pACDAAT1.

35 Se preparó un total de seis plásmidos para la coexpresión de ACD y AAT de diferentes secuencias (pACDAAT2, pACDAAT3, pACDAAT4, pACDAAT6 y pACDAAT8) usando la misma técnica que la técnica mencionada anteriormente (se remite a la figura 5).

Ejemplo 19: Producción de metacrilato de butilo a partir de recombinante que coexpresa ACD y AAT

40 Se transformó la cepa DMA008 obtenida en (3) del ejemplo de referencia 6 mediante los plásmidos pACDAAT1, pACDAAT2, pACDAAT3, pACDAAT4, pACDAAT6 y pACDAAT8, respectivamente. Usando los recombinantes obtenidos (DMA008/pACDAAT1, DMA008/pACDAAT2, DMA008/pACDAAT3, DMA008/pACDAAT4, DMA008/pACDAAT6 y DMA008/pACDAAT8), se realizó la producción de éster del ácido metacrílico mediante la reacción de microorganismos en reposo. Además, se usó DMA008/pLK005 como control.

45 A 2 ml de medio de cultivo líquido LB Km 10 (tubo de ensayo Wassermann), se le inoculó 1 asa de inoculación, y se cultivó durante 2 días a 30 °C con un agitador rotatorio (180 rpm) en condiciones aerobias (precultivo). A 100 ml de LB Km 10 (100 ml de medio de cultivo/matraz de tres bocas de 500 ml), se les inoculó 1 ml de caldo previo, y se realizó el cultivo durante 3 días a 30 °C en un agitador rotatorio (230 rpm) en condiciones aerobias (cultivo principal).

50 Tras el cultivo principal, se transfirieron 40 ml del caldo principal a un tubo cónico de 50 ml, y se centrifugó (12 000 rpm, 10 min), para obtener la célula bacteriana. Usando esta célula bacteriana, se realizó la reacción a continuación. A una botella de muestra de vidrio de 10 ml, se le añadió 1 ml de disolución de reacción para llevar a cabo la reacción durante 18 horas a 30 °C en un agitador rotatorio (180 rpm) en condiciones aerobias.

55 Composición de la disolución de reacción

DO630 = 10 células bacterianas (concentración final)

60 Ácido 2-oxoisovalérico 5,0 g/l (concentración final)

Alcohol 40 mM (concentración final)

Tampón fosfato de sodio 50 mM/pH 7,5 (concentración final)

65

Se usó n-butanol como alcohol.

Tras la reacción, se añadió 1 ml de acetonitrilo a la disolución de reacción y se mezcló bien, seguido por filtración usando un filtro de jeringa DISMIC/tamaño de poro de 0,45 µm (fabricado por ADVANTEC), y luego se analizó con el análisis de HPLC descrito en el ejemplo 9B. Los resultados de análisis del producto tras 18 horas se muestran en la tabla 10.

Formación de metacrilato de butilo a partir de recombinante que coexpresa ACD y AAT

10 [Tabla 10]

Recombinante	Cantidad generada de metacrilato de butilo (mM)
DMA008/pLK005	0
DMA008/pACDAAT1	7,51
DMA008/pACDAAT2	2,06
DMA008/pACDAAT3	4,34
DMA008/pACDAAT4	0,46
DMA008/pACDAAT6	2,18
DMA008/pACDAAT8	0,52

Ejemplo 20: Producción de éster del ácido metacrílico a partir de recombinante que coexpresa ACD y AAT

15 Se transformó la cepa DMA008 obtenida en (3) del ejemplo de referencia 6 mediante el plásmido pACDAAT1, respectivamente. Usando el recombinante obtenido (DMA008/pACDAAT1), se realizó la producción de éster del ácido metacrílico mediante la reacción de microorganismos en reposo. Además, se usó DMA008/pLK005 como control. Usando el método descrito en el ejemplo 19, se llevó a cabo el cultivo del recombinante para obtener la célula bacteriana.

20 Composición de la disolución de reacción

DO630 = 10 células bacterianas (concentración final)

25 Ácido 2-oxoisovalérico 5,0 g/l (concentración final) 40 mM

Alcohol (concentración final) 50 mM

30 Tampón fosfato de sodio 50 mM/pH 7,5 (concentración final)

30 Se usaron n-butanol, isobutanol y alcohol 2-etilhexílico como alcohol.

Tras la reacción, se añadió 1 ml de acetonitrilo a la disolución de reacción y se mezcló bien, seguido por filtración usando un filtro de jeringa DISMIC/tamaño de poro de 0,45 µm (fabricado por ADVANTEC), y luego se analizó con el análisis de HPLC descrito en el ejemplo 9B. Los resultados de análisis del producto tras 18 horas se muestran en la tabla 11.

Formación de éster del ácido metacrílico a partir de recombinante que coexpresa ACD y AAT

40 [Tabla 11]

Recombinante	Cantidad generada (mM)		
	Metacrilato de butilo	Metacrilato de isobutilo	Metacrilato de 2-etilhexilo
DMA008/pLK005	0	0	0
DMA008/pACDAAT1	0,01	0,006	0,02

Ejemplo comparativo 1: Reacción de síntesis de éster del ácido metacrílico a partir de extracto libre de células recombinante para el gen de AAT derivado de levaduras

45 Se prepararon plásmidos que expresaban el gen de AAT derivados de levaduras de manera similar al ejemplo 6 (Tabla 12), y se transformó *E. coli* usando estos para obtener recombinante que expresa AAT.

Plásmido de expresión del gen de AAT derivado de levaduras

50 [Tabla 12]

SEQ ID NO	Nombre del gen	Plásmido molde	Plásmido de expresión
-----------	----------------	----------------	-----------------------

			pTrc99A	pET16b
34	ATF1	pAAT005	pAAT105	pAAT205
36	ATF2	pAAT006	pAAT106	pAAT206

Se preparó un extracto libre de células de manera similar al ejemplo 7, y se realizó la reacción de síntesis de metacrilato de butilo con metacrilil-CoA y n-butanol como sustrato de manera similar al ejemplo 8. Como resultado de lo mismo, no se reconoció la formación de metacrilato de butilo. Por otro lado, en el caso de establecer acetil-CoA y n-butanol como sustrato, se reconoció la formación de acetato de butilo.

Formación de éster usando recombinante para el gen de AAT derivado de levaduras

[Tabla 13]

Recombinante	Cantidad generada (mM)					
	Metacrilato de butilo			Acetato de butilo		
	1 hora	3 horas	5 horas	30 min	1 hora	3 horas
JM109/pAAT105	0	0	0	0,089	0,145	0,170
JM109/pAAT106	0	0	0	0,104	0,189	0,290
JM109/pTrc99A	0	0	0	0	0	0

SEQ ID NO. 11: MMA-044

SEQ ID NO. 12: MMA-045

SEQ ID NO. 13: MMA-003

SEQ ID NO. 14: MMA-004

SEQ ID NO. 15: MMA-031

SEQ ID NO. 16: MMA-032

SEQ ID NO. 17: MAA-15

SEQ ID NO. 18: MAA-16

SEQ ID NO. 19: GB-138

SEQ ID NO. 20: GB-139

SEQ ID NO. 21: GB-140

SEQ ID NO. 22: GB-141

SEQ ID NO. 23: MMA-061

SEQ ID NO. 24: MMA-062

SEQ ID NO. 25: MMA-063

SEQ ID NO. 26: MMA-064

SEQ ID NO. 27: MMA-069

SEQ ID NO. 28: MMA-070

SEQ ID NO. 29: MMA-133

SEQ ID NO. 30: MMA-131

Lista de secuencias

<110> Mitsubishi Rayon Co., Ltd.

<120> MÉTODO PARA PRODUCIR ÁCIDO METACRÍLICO

<130> PMR-9009WO

5 <150> Documento JP2012-198840
<151> 10-09-2012

10 <150> documento JP2013-160300
<151> 01-08-2013

15 <150> documento JP2013-170404
<151> 20-08-2013

<160> 37

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 455

20 <212> PRT

<213> *Malus domestica* (MpAAT1)

<400> 1

Met	Lys	Ser	Phe	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Lys	Arg	Leu	Gln	Pro	Glu	Leu
1									10						15

Ile	Thr	Pro	Ala	Lys	Ser	Thr	Pro	Gln	Glu	Thr	Lys	Phe	Leu	Ser	Asp
20								25						30	

Ile	Asp	Asp	Gln	Glu	Ser	Leu	Arg	Val	Gln	Ile	Pro	Ile	Ile	Met	Cys
35							40						45		

Tyr	Lys	Asp	Asn	Pro	Ser	Leu	Asn	Lys	Asn	Arg	Asn	Pro	Val	Lys	Ala
50						55						60			

Ile	Arg	Glu	Ala	Leu	Ser	Arg	Ala	Leu	Val	Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Leu	Ala
65						70			75				80		

Gly	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Pro	Asn	Arg	Lys	Leu	Val	Val	Asp	Cys	Asn
85								90					95		

Gly	Glu	Gly	Ile	Leu	Phe	Val	Glu	Ala	Ser	Ala	Asp	Val	Thr	Leu	Glu
100								105					110		

Gln	Leu	Gly	Asp	Lys	Ile	Leu	Pro	Pro	Cys	Pro	Leu	Leu	Glu	Glu	Phe
115						120						125			

Leu	Tyr	Asn	Phe	Pro	Gly	Ser	Asp	Gly	Ile	Ile	Asp	Cys	Pro	Leu	Leu
130						135						140			

ES 2 689 477 T3

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

Arg Leu Asn His Thr Met Cys Asp Ala Ala Gly Leu Leu Leu Phe Leu
165 170 175

Thr Ala Ile Ala Glu Met Ala Arg Gly Ala His Ala Pro Ser Ile Leu
180 185 190

Pro Val Trp Glu Arg Glu Leu Leu Phe Ala Arg Asp Pro Pro Arg Ile
195 200 205

Thr Cys Ala His His Glu Tyr Glu Asp Val Ile Gly His Ser Asp Gly
210 215 220

Ser Tyr Ala Ser Ser Asn Gln Ser Asn Met Val Gln Arg Ser Phe Tyr
225 230 235 240

Phe Gly Ala Lys Glu Met Arg Val Leu Arg Lys Gln Ile Pro Pro His
245 250 255

Leu Ile Ser Thr Cys Ser Thr Phe Asp Leu Ile Thr Ala Cys Leu Trp
260 265 270

Lys Cys Arg Thr Leu Ala Leu Asn Ile Asn Pro Lys Glu Ala Val Arg
275 280 285

Val Ser Cys Ile Val Asn Ala Arg Gly Lys His Asn Asn Val Arg Leu
290 295 300

Pro Leu Gly Tyr Tyr Gly Asn Ala Phe Ala Phe Pro Ala Ala Ile Ser
305 310 315 320

Lys Ala Glu Pro Leu Cys Lys Asn Pro Leu Gly Tyr Ala Leu Glu Leu
325 330 335

Val Lys Lys Ala Lys Ala Thr Met Asn Glu Glu Tyr Leu Arg Ser Val
340 345 350

Ala Asp Leu Leu Val Leu Arg Gly Arg Pro Gln Tyr Ser Ser Thr Gly
355 360 365

Ser Tyr Leu Ile Val Ser Asp Asn Thr Arg Val Gly Phe Gly Asp Val
370 375 380

Asn Phe Gly Trp Gly Gln Pro Val Phe Ala Gly Pro Val Lys Ala Leu
385 390 395 400

ES 2 689 477 T3

Asp Leu Ile Ser Phe Tyr Val Gln His Lys Asn Asn Thr Glu Asp Gly
405 410 415

Ile Leu Val Pro Met Cys Leu Pro Ser Ser Ala Met Glu Arg Phe Gln
420 425 430

Gln Glu Leu Glu Arg Ile Thr Gln Glu Pro Lys Glu Asp Ile Cys Asn
435 440 445

Asn Leu Arg Ser Thr Ser Gln
450 455

<210> 2
<211> 1368

5 <212> ADN
<213> *Malus domestica* (MpAAT1)

<400> 2
atgaaatcat tctcagtact tcaggtgaaa cgattgcaac cggaacttat aactccggca 60
aagtcaacgc ctcaagaaaac aaagtttctc tcagatattg acgaccaaga aagcttgaga 120
gttcagattc caatcataat gtgttacaaa gacaaccctt cacttaataa aaatcgtaat 180
cccgttaagg caatttaggga agccttaagt agagcattag tgtattacta ccccttagct 240
ggaaggctta gggaaagggcc taatagaaag ctcgtggtcg attgcaatgg tgaaggatc 300
ttgttcgttg aggcttctgc tgatgtcaca cttgagcaac taggagacaa aattctaccc 360
ccttgcac tttagagga gttcttatat aattttccag gctctgatgg aattattgtat 420
tgtccttgc tgctgattca ggtgacctgt cttacatgtg gaggtttcat acttgcattg 480
cgccctaaacc acacaatgtg tgatgcagct ggattgctct tgttcctgac cgccatcgcg 540
gagatggcaa gaggcgcaca tgcaccatct attctaccag tgtgggagag agagcttttg 600
ttcgctcgag atccaccaag aattacatgt gctcatcacg aatatgaaga cgtgattgg 660
cattctgatg gtcatacgc atccagtaac cagtcaaaca tggttcaacg atctttctac 720
tttggtgcca aggagatgag agtccttcga aaacagattc cacccccacct aatttccact 780
tgctccacat ttgacttgat cacagcttgt ttgtggaaat gtcgcactct tgcacttaac 840
attaatccaa aagaggctgt tcgagttca tgcattgtca atgcacgagg aaagcacaac 900
aatgtacgtc ttcccttggg atactatggc aatgcatttg catttccagc tgcaatttcg 960
aaggctgaac ctctatgcaa aaatccactg ggatatgctt tggagttggc gaagaaggct 1020
aaagctacca tgaatgaaga atacttaaga tcagtggcag atcttttggt actaagaggg 1080
cgacctcaat attcatcgac aggaagttat ttaatagttt ctgataatac gcgtgttaggt 1140
tttggagatg tcaattttgg atggggacag ccggatattg ctggacccgt caaggcattg 1200

ES 2 689 477 T3

gatttgatta gcttctacgt tcaacacaaa aacaacacag aggatggaat attggcacca 1260
 atgtgtttgc catcctcggc catggagaga tttcagcagg aactagagag gattactcg 1320
 gaaccttaagg aggatatatg taacaaccctt agatcaacta gtcaatga 1368
 <210> 3
 <211> 452
 5 <212> PRT
 <213> *Fragaria ananassa* (SAAT)

<400> 3			
Met Asn Lys Ile Glu Val Ser Ile Asn Ser Lys His Thr Ile Lys Pro			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Ser Thr Pro Leu Gln Pro Tyr Lys Leu Thr Leu Leu Asp			
20	25	30	
Gln Leu Thr Pro Pro Ala Tyr Val Pro Ile Val Phe Phe Tyr Pro Ile			
35	40	45	
Thr Asp His Asp Phe Asn Leu Pro Gln Thr Leu Ala Asp Leu Arg Gln			
50	55	60	
Ala Leu Ser Glu Thr Leu Thr Tyr Tyr Pro Leu Ser Gly Arg Val			
65	70	75	80
Lys Asn Asn Leu Tyr Ile Asp Asp Phe Glu Glu Gly Val Pro Tyr Leu			
85	90	95	
Glu Ala Arg Val Asn Cys Asp Met Thr Asp Phe Leu Arg Leu Arg Lys			
100	105	110	
Ile Glu Cys Leu Asn Glu Phe Val Pro Ile Lys Pro Phe Ser Met Glu			
115	120	125	
Ala Ile Ser Asp Glu Arg Tyr Pro Leu Leu Gly Val Gln Val Asn Val			
130	135	140	
Phe Asp Ser Gly Ile Ala Ile Gly Val Ser Val Ser His Lys Leu Ile			
145	150	155	160
Asp Gly Gly Thr Ala Asp Cys Phe Leu Lys Ser Trp Gly Ala Val Phe			
165	170	175	
Arg Gly Cys Arg Glu Asn Ile Ile His Pro Ser Leu Ser Glu Ala Ala			
180	185	190	

ES 2 689 477 T3

Leu Leu Phe Pro Pro Arg Asp Asp Leu Pro Glu Lys Tyr Val Asp Gln
195 200 205

Met Glu Ala Leu Trp Phe Ala Gly Lys Lys Val Ala Thr Arg Arg Phe
210 215 220

Val Phe Gly Val Lys Ala Ile Ser Ser Ile Gln Asp Glu Ala Lys Ser
225 230 235 240

Glu Ser Val Pro Lys Pro Ser Arg Val His Ala Val Thr Gly Phe Leu
245 250 255

Trp Lys His Leu Ile Ala Ala Ser Arg Ala Leu Thr Ser Gly Thr Thr
260 265 270

Ser Thr Arg Leu Ser Ile Ala Ala Gln Ala Val Asn Leu Arg Thr Arg
275 280 285

Met Asn Met Glu Thr Val Leu Asp Asn Ala Thr Gly Asn Leu Phe Trp
290 295 300

Trp Ala Gln Ala Ile Leu Glu Leu Ser His Thr Thr Pro Glu Ile Ser
305 310 315 320

Asp Leu Lys Leu Cys Asp Leu Val Asn Leu Leu Asn Gly Ser Val Lys
325 330 335

Gln Cys Asn Gly Asp Tyr Phe Glu Thr Phe Lys Gly Lys Glu Gly Tyr
340 345 350

Gly Arg Met Cys Glu Tyr Leu Asp Phe Gln Arg Thr Met Ser Ser Met
355 360 365

Glu Pro Ala Pro Asp Ile Tyr Leu Phe Ser Ser Trp Thr Asn Phe Phe
370 375 380

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

Gly Lys Ile Glu Ser Ala Ser Cys Lys Phe Ile Ile Leu Val Pro Thr
405 410 415

Gln Cys Gly Ser Gly Ile Glu Ala Trp Val Asn Leu Glu Glu Lys
420 425 430

Met Ala Met Leu Glu Gln Asp Pro His Phe Leu Ala Leu Ala Ser Pro
435 440 445
Lys Thr Leu Ile
450

<210> 4
 <211> 1359
 <212> ADN
 5 <213> *Fragaria ananassa* (SAAT)

<400> 4
 atgaacaaaa ttgaggtcag tataaattcc aaacacacca tcaaaccatc aacttcctct 60
 acaccacttc agccttacaa gcttaccctc ctggaccagc tcactcctcc ggcgtatgtc
 cccatcggt tcttctaccc cattactgac catgacttca atcttcctca aacccttagct 120
 gacttaagac aagcccttc ggagactctc actttgtact atccactctc tggaagggtc
 aaaaacaacc tatacatcga tgatttgaa gaaggtgtcc cataccttga ggctcgagtg
 aattgtgaca tgactgattt tctaaggctt cgaaaaatcg agtgccttaa tgagtttgtt
 ccaataaaac catttagtat ggaagcaata tctgatgagc gttaccctt gcttggagtt
 caagtcaacg ttttcgattc tggaatagca atcgggtctt ccgtctctca caagctcatc
 gatggaggaa cggcagactg ttttctcaag tcctgggtg ctgttttgc aggggtgtcgt 540
 gaaaatatca tacatcctag tctctctgaa gcagcattgc ttttcccacc gagagatgac
 ttgcctgaaa agtatgtcga tcagatggaa gcgttatggt ttgccggaaa aaaagttgct
 acaaggagat ttgtatttgg tgtgaaagcc atatcttcaa ttcaagatga agcgaagagc
 gagtccgtgc ccaagccatc acgagttcat gccgtcaactg gtttctctg gaaacatcta
 atcgctgctt ctcggcact aacatcaggt actacttcaa caagactttc tatagcggcc
 caggcagtga acttaagaac acggatgaac atggagacag tgttggataa tgccactgga
 aacttgttct ggtggcaca ggccatacta gagctaagtc atacaacacc agagatcagt
 gatcttaagc tgtgtgactt ggttaacttg ctcaatggat ctgtcaaaca atgtaacgg 960
 gattactttg agacttcaa gggtaaagag ggatatggaa gaatgtgcga gtatctagat
 tttcagagga ctatgagttc tatggAACCA gcaccggata tttattttt ctcgagctgg
 actaattttt tcaacccact tgattttgga tggggagga catcatggat tggagttgca
 ggaaaaattt aatctgcaag ttgcaagttc ataatattag ttccaacaca atgcggttct
 ggaattgaag cgtgggtgaa tctagaagaa gagaaaatgg ctatgctaga acaagatccc
 cattttctag cgtagcatc tccaaagacc ttaatttaa 1359

10 <210> 5
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> *Fragaria vesca* (VAAT)

15 <400> 5

ES 2 689 477 T3

Met Asn Lys Ile Glu Val Ser Ile Ile Ser Lys His Thr Ile Lys Pro
1 5 10 15

Ser Thr Ser Ser Pro Leu Gln Pro Tyr Lys Leu Thr Leu Leu Asp
20 25 30

Gln Leu Thr Pro Pro Ser Tyr Val Pro Met Val Phe Phe Tyr Pro Ile
35 40 45

Thr Gly Pro Ala Val Phe Asn Leu Gln Thr Leu Ala Asp Leu Arg His
50 55 60

Ala Leu Ser Glu Thr Leu Thr Tyr Tyr Pro Leu Ser Gly Arg Val
65 70 75 80

Lys Asn Asn Leu Tyr Ile Asp Asp Phe Glu Glu Gly Val Pro Tyr Leu
85 90 95

Glu Ala Arg Val Asn Cys Asp Met Asn Asp Phe Leu Arg Leu Pro Lys
100 105 110

Ile Glu Cys Leu Asn Glu Phe Val Pro Ile Lys Pro Phe Ser Met Glu
115 120 125

Ala Ile Ser Asp Glu Arg Tyr Pro Leu Leu Gly Val Gln Val Asn Ile
130 135 140

Phe Asn Ser Gly Ile Ala Ile Gly Val Ser Val Ser His Lys Leu Ile
145 150 155 160

Asp Gly Arg Thr Ser Asp Cys Phe Leu Lys Ser Trp Cys Ala Val Phe
165 170 175

Arg Gly Ser Arg Asp Lys Ile Ile His Pro Asn Leu Ser Gln Ala Ala
180 185 190

Leu Leu Phe Pro Pro Arg Asp Asp Leu Pro Glu Lys Tyr Ala Arg Gln
195 200 205

Met Glu Gly Leu Trp Phe Val Gly Lys Lys Val Ala Thr Arg Arg Phe
210 215 220

Val Phe Gly Ala Lys Ala Ile Ser Val Ile Gln Asp Glu Ala Lys Ser
225 230 235 240

Glu Ser Val Pro Lys Pro Ser Arg Val Gln Ala Val Thr Ser Phe Leu

ES 2 689 477 T3

245

250

255

Trp Lys His Leu Ile Ala Thr Ser Arg Ala Leu Thr Ser Gly Thr Thr
 260 265 270

Ser Thr Arg Leu Ser Ile Ala Thr Gln Val Val Asn Ile Arg Ser Arg
 275 280 285

Arg Asn Met Glu Thr Val Trp Asp Asn Ala Ile Gly Asn Leu Ile Trp
 290 295 300

Phe Ala Pro Ala Ile Leu Glu Leu Ser His Thr Thr Leu Glu Ile Ser
 305 310 315 320

Asp Leu Lys Leu Cys Asp Leu Val Asn Leu Leu Asn Gly Ser Val Lys
 325 330 335

Gln Cys Asn Gly Asp Tyr Phe Glu Thr Phe Met Gly Lys Glu Gly Tyr
 340 345 350

Gly Ser Met Cys Glu Tyr Leu Asp Phe Gln Arg Thr Met Ser Ser Met
 355 360 365

Glu Pro Ala Pro Glu Ile Tyr Leu Phe Thr Ser Trp Thr Asn Phe Phe
 370 375 380

Asn Gln Leu Asp Phe Gly Trp Gly Arg Thr Ser Trp Ile Gly Val Ala
 385 390 395 400

Gly Lys Ile Glu Ser Ala Phe Cys Asn Leu Thr Thr Leu Val Pro Thr
 405 410 415

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

Met Ala Met Leu Glu Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ala Leu Ala Ser Pro
 435 440 445

Lys Thr Leu Ile Ser Arg Tyr
 450 455

<210> 6
 <211> 1368
 <212> ADN

5 <213> *Fragaria vesca* (VAAT)

<400> 6
 atgaacaaaa ttgaggtcag tataatttcc aaacacacca tcaaaccatc aacttcctct 60

ES 2 689 477 T3

tcaccactc	agccttacaa	gcttaccctg	ctcgaccagc	tcactcctcc	atcgatatgtc	120
cccatggtat	tcttctaccc	cattactggc	cctgcagtct	tcaatcttca	aacccttagct	180
gacttaagac	atgcccttc	cgagactctc	actttgtact	atccactctc	tggaagggtc	240
aaaaacaacc	tatacatcga	tgattttgaa	gagggtgtcc	cataccttga	ggctcgagtg	300
aactgtgaca	tgaatgattt	tctaaggctt	ccgaaaatcg	agtgcctaaa	tgagtttgg	360
ccaataaaac	catttagtat	ggaagcaata	tctgatgagc	gttacccttt	gctcggagtt	420
caagttaaca	tttcaactc	cggaatagca	atcggggct	ccgtctctca	caagctcatc	480
gatggaagaa	cttcagactg	tttctcaag	tcgtgggtgt	ctgttttcg	tggttctcg	540
gacaaaatca	tacatcctaa	tctctctcaa	gcagcattgc	tttcccacc	aagagatgac	600
ttgcctgaaa	agtatgccc	tcagatggaa	gggttatgg	ttgtcgaaa	aaaagttgct	660
acaaggagat	ttgtatttgg	tgcgaaagcc	atatctgtaa	ttcaagatga	agcaaagagc	720
gagtccgtgc	ccaagccatc	acgagttcag	gctgtcacta	gttttctctg	gaaacatcta	780
atcgctactt	ctcgggcact	aacatcaggt	actacttcaa	caagactttc	tatagcaacc	840
caggtagtga	acataagatc	acggaggaac	atggagacag	tgtggataa	tgccattgga	900
aacttgat	gttgcgtcc	ggccatacta	gagctaagtc	atacaacact	agagatcagt	960
gatcttaagc	tgtgtgactt	gtttaacttg	ctcaatggat	ctgtcaaaca	atgtaacgg	1020
gattactttg	agactttcat	ggtaaagag	ggatatggaa	gcatgtgcga	gtatctagat	1080
tttcagagga	ctatgagttc	tatggaacca	gcaccagaga	tttattttt	cacgagctgg	1140
actaattttt	tcaaccaact	tgattttgga	tgggggagga	catcatggat	tggagttgca	1200
ggaaaaattt	aatctgcatt	ttgcaatctc	acaacattag	ttccaacacc	atgcgatact	1260
ggaattgaag	cgtgggtgaa	tctagaagaa	gaaaaatgg	ctatgtaga	acaagatccc	1320
cagtttctag	cactagcatc	tccaaagacg	ctaatttcaa	gatattga		1368

<210> 7

<211> 387

5 <212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa PAO1 (acd1)*

<400> 7

Met	Asp	Phe	Asp	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Leu	Leu	Val	Glu	Ser	Ala
1															

Arg	Ala	Phe	Ala	Arg	His	Glu	Lle	Ala	Pro	Lys	Ala	Ala	Asp	Trp	Asp
20															

Arg	Asp	His	His	Phe	Pro	Val	Glu	Val	Ile	Arg	Ala	Ala	Glu	Gln
35														

ES 2 689 477 T3

Gly Tyr Leu Gly Leu Tyr Ile Ala Glu Glu Asp Gly Gly Leu Gly Leu
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Thr Ser Leu Ile Phe Glu Gln Leu Ala Ala Gly Cys
65 70 75 80

Val Ala Thr Thr Ala Tyr Ile Ser Ile His Asn Met Ala Ala Trp Met
85 90 95

Leu Ala Ser Phe Gly Asp Ala Ala Leu Lys Glu Ala Trp Leu Pro Gly
100 105 110

Leu Ile Gly Gly Glu Ser Leu Ala Ser Tyr Cys Leu Thr Glu Pro Asp
115 120 125

Ala Gly Ser Asp Ala Ala Arg Leu Arg Thr Arg Ala Arg Arg Glu Gly
130 135 140

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

Ser Thr Gln Val Leu Ile Val Met Ala Arg Thr Gly Glu Asp Gly Ala
165 170 175

Arg Gly Ile Ser Cys Phe Leu Val Pro Ala Asp Ala Pro Gly Ile Arg
180 185 190

Tyr Gly Arg Asn Glu Asp Lys Met Gly Trp Arg Ala Gln Pro Thr Arg
195 200 205

Thr Ile Thr Phe Glu Gly Val Arg Ile Pro Ala Gly Asn Arg Ile Gly
210 215 220

Pro Glu Gly Gln Gly Phe Val Tyr Ala Met Lys Gly Leu Asp Gly Gly
225 230 235 240

Arg Leu Asn Ile Ala Ser Cys Ser Leu Gly Ala Ala Gln Ala Ala Leu
245 250 255

Glu Gln Ser Met Arg Tyr Val Glu Glu Arg Glu Gln Phe Gly Lys Pro
260 265 270

Leu Ala Thr Phe Gln Ala Leu Gln Phe Lys Leu Ala Asp Met Leu Thr
275 280 285

Glu Leu Thr Ala Ser Arg Gln Met Val Arg Leu Gly Ala His Arg Leu
290 295 300

ES 2 689 477 T3

Asp Arg Gly Asp Ala Glu Ala Thr Leu Tyr Cys Ala Met Ala Lys Arg
 305 310 315 320

Phe Ala Thr Asp Arg Cys Phe Asp Val Cys Asn Glu Ala Leu Gln Leu
 325 330 335

His Gly Gly Tyr Gly Tyr Leu Asn Asp Tyr Pro Leu Glu Arg Trp Val
 340 345 350

Arg Asp Thr Arg Val His Gln Ile Leu Glu Gly Thr Asn Glu Ile Met
 355 360 365

Arg Val Ile Val Ala Arg Arg Leu Leu Glu Gln Gly Gly Met Leu Asp
 370 375 380

Arg Leu Leu
 385

<210> 8

<211> 1164

5 <212> ADN

<213> *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (acd1)

<400> 8

atggatttcg acctcaccga agaacaacgc ctgctggtgg agagcgcccg cgccttcgccc	60
cggcacgaac tggcgccgaa ggcggccgac tggaccgac accatcaactt cccgggtggaa	120
gtcatcccgcc cccggccgaa acagggtac ctccggctgt acatccggaa ggaagacggc	180
ggcctgggcc tgtcgccgct gtccacttcg ctgatcttcg agcaactggc cgccggctgc	240
gtggccacta ccgcctacat cagcatccac aacatggccg cctggatgct cgccctcggtc	300
ggcgacgccc cgctgaagga ggcctggctg cccggctga tcggcgccga gtccgtcgcc	360
tcctattgcc tgaccgagcc cgatgcccgc tccgacgccc cgccgtcgcc cacccgccc	420
cggccgcgagg gcgacgaata cgtgctggac ggcagcaagt gtttcatttc cggccgcggc	480
agcaccagg tgctgatcgt catggcgccg accggcgagg acggcgccag gggcatctcc	540
tgcttcctgg taccggccga cggccccggc atccgctacg gcccgaacga ggacaagatg	600
ggctggcgcc cgcaagccgac cccgaccatc accttcgaag gcgtgcgcac ccccgccggc	660
aaccgcattcg gcccggaggg ccaaggcttc gtctatgcca tgaaaggcct cgacggcgcc	720
cgcctgaaca tcgcccagg ttccctggc gcccggcagg cggcgctgga gcagtcgatg	780
cgctacgtcg aggagcgccga gcagttcgcc aagccgctgg cgaccttcca ggccttgcag	840
ttcaagctcg cgcacatgct caccgaactc accggccagcc gccagatggt cgcctcgcc	900
gccccatcgcc tggaccgccc cgacgcccggag gcgaccctgt actgcgcaat ggccaagcgcc	960

ES 2 689 477 T3

	ttcgccaccc accgctgctt cgatgtctgc aacgaggcct tgcaactgca cggcggctac	1020		
	ggcttatctca acgattatcc gctggagcgc tgggtacgcg acacccgcgt gcaccagatc	1080		
	ctcgaaggca ccaacgaaat catgcgggtg atcgtcgccc gccgcctgct ggagcagggc	1140		
	ggcatgctcg atcgcctgct gtga	1164		
	<210> 9			
	<211> 258			
5	<212> PRT			
	<213> <i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4 (RE_echA)			
	<400> 9			
	Met Thr Asp Phe Asn Thr Ile Ile Leu Glu Arg Lys Gly Arg Val Gly			
1	5	10	15	
	Val Ile Thr Leu Asn Arg Pro Lys Ala Leu Asn Ala Leu Asn Ser Glu			
	20	25	30	
	Leu Met Asn Glu Val Val Ala Ala Val Ala Asp Leu Glu Ala Asp Asn			
	35	40	45	
	Gly Ile Gly Ala Ile Leu Ile Thr Gly Ser Glu Arg Ala Phe Ala Ala			
	50	55	60	
	Gly Ala Asp Ile Lys Glu Met Gln Ser Lys Thr Tyr Met Asp Ala Tyr			
	65	70	75	80
	Val Glu Asp Phe Phe Thr Pro Trp Asp Arg Val Ala Ala Ala Arg Lys			
	85	90	95	
	Pro Leu Ile Ala Ala Val Ser Gly Tyr Ala Leu Gly Gly Cys Glu			
	100	105	110	
	Leu Ala Met Leu Cys Asp Phe Ile Ile Ala Ser Asp Thr Ala Lys Phe			
	115	120	125	
	Gly Gln Pro Glu Ile Lys Leu Gly Val Ile Pro Gly Ile Gly Gly Ser			
	130	135	140	
	Gln Arg Leu Thr Arg Ala Val Gly Lys Ala Lys Ala Met Glu Leu Cys			
	145	150	155	160
	Leu Thr Gly Arg Asn Met Asp Ala Glu Glu Ala Glu Arg Ala Gly Leu			
	165	170	175	
	Val Ala Arg Ile Val Pro Ala Ala Asp Leu Leu Asp Asp Ala Leu Lys			
	180	185	190	

ES 2 689 477 T3

Thr Ala Thr Thr Ile Ala Glu Met Ser Leu Pro Ile Ala Met Met Met Ala
195 200 205

Lys Glu Ala Val Asn Arg Ser Phe Glu Thr Thr Leu Ala Glu Gly Val
210 215 220

Arg Phe Glu Arg Arg Val Phe His Ser Thr Phe Ala Thr Glu Asp Gln
225 230 235 240

Lys Glu Gly Met Thr Ala Phe Val Glu Lys Arg Ser Ala Glu Phe Lys
245 250 255

His Arg

<210> 10

<211> 777

5 <212> ADN

<213> *Rhodococcus erythropolis* PR4 (RE_echA)

<400> 10
gtgaccgact tcaacaccat catcctcgag cgtaagggtc gcgtcggcgt catcacgctc 60
aacccggccga aggctctcaa cgccctgaac tccgagctga tgaacgaggt cgtcgcccgc 120
gttgcgcgacc tcgaagcggaa caacggcatc ggagccatcc tgatcaccgg ttccgagcgc 180
gccttcgcccgc cccggcgccga catcaaggaa atgcagtcca agacgtacat ggacgcatac 240
gtcgaagatt tcttcaccccc gtgggaccgc gtcgcagccg ctgcgtaaagcc gctgatcgcc 300
gccgtctccg ggtacgcgct cggtggtggc tgcgaaactgg cgatgctctg cgatttcatc 360
atcgcttcgg ataccgcgaa gttcggccag cccgagatca agctcggtgt cattccgggt 420
atcggtgtggct cacagcgcct tacgcgcgcc gtgggttaagg ccaaggccat ggagctgtgc 480
ctgaccggcc gcaacatgga cgcagaagag gccgagcgcg caggcctggc tgcccgatc 540
gttccggccg ccgatctgct cgacgacgca ttgaagaccc caaccaccat cgccgagatg 600
tcgctgccc tgcgtatgtat ggccaaggaa gcggtaacc gttccttcga gaccacactc 660
gccgaggccgc tccgcttcga gcgtcgggtg ttccactcga cttcgcgac ggaggatcag 720
aaggaaggca tgaccgcgtt cgtggagaag cggccgcgcg agttcaagca ccgctga 777

10

<210> 11

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> MMA-044

-228- MWV 844

20 qtttgcacqc ctqccqttcq acq 23

<210> 12

<211> 23

	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> MMA-0045	
	<400> 12 cggtacgcgc ggtatccca gag	23
10	<210> 13 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> MMA-003	
	<400> 13 gaccatgg ttcgaccc accgaagaac	30
20	<210> 14 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> MMA-004	
	<400> 14 gccctgcagg atgcgatgg tcgcggcggt c	31
30	<210> 15 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> MMA-031	
40	<400> 15 ggcatgacc gactcaaca ccatcatcct c	31
	<210> 16 <211> 34	
45	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> MMA-032	
50	<400> 16 ggcctgcagg tttagctgtt cgaaagttca ggc	34
	<210> 17 <211> 26	
55	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> MAA-15	
	<400> 17 ggcctgtcat gagtgattac gagccg	26
65	<210> 18 <211> 32	

ES 2 689 477 T3

	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> MAA-16	
	<400> 18 cgccctgca ggtcgcggg aatcagatgt gc	32
10	<210> 19 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> GB-138	
	<400> 19 ggcctgcagg taccgatcat caccatcggt gtc	33
20	<210> 20 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> GB-139	
	<400> 20 ggcttagact gagcagtgtt ccaatgcg	28
30	<210> 21 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> GB-140	
40	<400> 21 gaggaaatgg tcacagggcg agaataggtt g	31
	<210> 22 <211> 29	
45	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> GB-141	
50	<400> 22 gccctgtgac cattcctca ttgtgctgg	29
	<210> 23 <211> 35	
55	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> MMA-061	
	<400> 23 cgactctaga ggatcgctca gtacatctac gagac	35
65	<210> 24 <211> 30	

	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> MMA-062	
10	<400> 24 agtgtgagga aagtgttccg atcagttcat	30
15	<210> 25 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> MMA-063	
25	<400> 25 cactttcctc acactcgatcg agagttatgag	30
30	<210> 26 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> MMA-064	
40	<400> 26 cggttacccgg ggatcagcgc gacgaacaac gagac	35
45	<210> 27 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> MMA-069	
55	<400> 27 gcatctac aaggaagaga tc	22
60	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> MMA-070	
70	<400> 28 gcaacgtctca tcgagatctc	20
75	<210> 29 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
80	<220> <223> MMA-133	
85	<400> 29 tgacctgcag gtgcactccg ctgcgacatg tatcga	36
90	<210> 30 <211> 45	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> MMA-131	
	<400> 30	
	actctagcct gcaggtcatt gactagtta tctaagggtt ttaca	45
10	<210> 31	
	<211> 1520	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	
15	<400> 31	
	tcaacggaga gtttgatcct ggctcaggac gaacgctggc ggcgtgctta acacatgcaa	60
	gtcgagcggt aaggcctttc ggggtacacg agcggcgaac gggtgagtaa cacgtgggtg	120
	atctgccctg cacttcggga taagcctggg aaactgggtc taataccgga tatgacacct	180
	ggttgcatga cttggggtgg aaagatttat cggtgcagga tgggcccccg gcctatcagc	240
	ttgttggtgg gttaatggcc taccaaggcg acgacgggta gccgacctga gagggtgacc	300
	ggcccacactg ggactgagac acggcccaga ctccctacggg aggcagcagt gggaaatatt	360
	gcacaatggg cgaaagcctg atgcagcgac gccgcgtgag ggatgacggc cttcgggttg	420

ES 2 689 477 T3

taaacctctt tcagcaggga cgaagcgcaa gtgacggcac ctgcagaaga agcaccggct	480
aactacgtgc cagcagccgc ggtataacgt agggtgcaag cgttgtccgg aattactggg	540
cgtaaagagt tcgttaggcgg tttgtcgctg cgtttgtgaa aaccagcagc tcaactgctg	600
gcttgcaggc gatacggca gacttgagta ctgcagggga gactgaaatt cctgggttag	660
cggtgaaatg cgcagatatac aggaggaaca ccggtggcga aggcccgtct ctggcagta	720
actgacgctg aggaacgaaa gcgtggtag cgaacaggat tagataccct ggtagtcac	780
gccgtaaacg gtggcgcta ggtgtgggtt cttccacgg aatccgtgcc gtagctaacg	840
cattaagcgc cccgcctggg gagtacggcc gcaaggctaa aactcaaagg aattgacggg	900
ggccccgcaca agcggcggag catgtggatt aattcgatgc aacgcgaaga accttacctg	960
ggtttgcacat ataccggaaa gctgcagaga tgtggccccc cttgtggtag gtatacaggt	1020
ggtgcattggc tgtcgtcagc tcgtgtcgtag agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc	1080
aacctatc ttatgttgcc agcacgttat ggtggggact cgtaagagac tgccggggtc	1140
aactcggagg aaggtgggaa cgacgtcaag tcatcatgcc cttatgtcc agggcttcac	1200
acatgctaca atggccagta cagagggctg cgagaccgtg aggtggagcg aatccctaa	1260
agctggtctc agttcggatc ggggtctgca actcgacccc gtgaagtcgg agtcgctagt	1320
aatcgcagat cagcaacgct gcggtaata cttccggg cttgtacac accgcccgtc	1380
acgtcatgaa agtcggtaac acccgaagcc ggtggcttaa ccccttgtgg gagggagccg	1440
tcgaaggtagtgg gatcggcgat tggacgaaag tcgtaacaag gtagccgtac cggaaaggtagc	1500
ggctggatca ctcctttct	1520

<210> 32

<211> 386

5 <212> PRT

<213> Rhodococcus erythropolis PR4 RE_Acd1

<400> 32

Met	Phe	Thr	Leu	Thr	Asp	Asp	Glu	Arg	Ala	Ile	Arg	Asp	Thr	Ala	Arg
1					5				10				15		

Asp	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Leu	Ala	Pro	Asn	Ala	Val	Glu	Trp	Asp	Gln
					20			25				30			

Thr	Lys	His	Phe	Pro	Val	Asp	Val	Leu	Arg	Lys	Ala	Ala	Ser	Ieu	Gly
						35		40					45		

Met	Gly	Gly	Ile	Tyr	Ile	Arg	Glu	Asp	Val	Gly	Gly	Ser	Glu	Ieu	Ser
						50		55				60			

Arg	Val	Asp	Ala	Ala	Arg	Ile	Phe	Glu	Glu	Ieu	Ala	Lys	Gly	Asp	Pro
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ES 2 689 477 T3

65

70

75

80

Ser Ile Ala Ala Tyr Ile Ser Ile His Asn Met Val Thr Trp Met Ile
85 90 95

Asp Gln Phe Gly Asn Asp Glu Gln Arg His Lys Trp Val Pro Gly Leu
100 105 110

Cys Ser Met Asp Gln Leu Gly Ser Tyr Cys Leu Thr Glu Pro Gly Ala
115 120 125

Gly Ser Asp Ala Ala Gly Leu Ser Thr Lys Ala Val Arg Asp Gly Asp
130 135 140

Asp Tyr Ile Leu Asn Gly Val Lys Gln Phe Ile Ser Gly Ala Gly Thr
 145 150 155 160

Ser Asp Val Tyr Val Val Met Ala Arg Thr Gly Ser Ala Gly Ala Lys
165 170 175

Gly Ile Ser Ala Phe Ile Val Pro Lys Asp Ser Pro Gly Leu Ser Phe
180 185 190

Gly Ala Asn Glu Val Lys Met Gly Trp Asn Ala Gln Pro Thr Arg Gln
195 200 205

Val Ile Phe Glu Asp Val Arg Val Pro Ala Ala Asn Met Leu Gly Glu
210 215 220

Glu Gly Ser Gly Phe Arg Ile Ala Met Lys Gly Leu Asn Gly Gly Arg
225 230 235 240

Leu Asn Ile Ala Ala Cys Ser Val Gly Gly Ala Gln Ala Ala Leu Glu
245 250 255

Lys Ala Val Ala Tyr Leu Val Asp Arg Lys Ala Phe Gly Ser Ala Leu
260 265 270

Ile Glu Ser Gln Ala Leu Gln Phe Gln Leu Ala Asp Met Arg Thr Glu
275 280 285

Leu Glu Ala Ala Arg Thr Leu Leu Trp Arg Ala Ala Ala Ala Leu Glu
290 295 300

Asp Gly Ala Ser Asp Val Val Glu Leu Cys Ala Met Ala Lys Arg Phe
305 310 315 320

ES 2 689 477 T3

Ala Thr Asp Thr Gly Phe Asp Val Ala Asn Lys Ala Leu Gln Leu His
 325 330 335

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

Asp Leu Arg Val His Gln Ile Leu Glu Gly Ser Asn Glu Ile Met Arg
 355 360 365

Val Val Ile Ala Arg Ser Val Val Ala Ser Gly Gln Gly Lys Gln Gly
 370 375 380

Ala Ala
 385

<210> 33

<211> 1161

5 <212> ADN

<213> *Rhodococcus erythropolis PR4 RE_Acd1*

<400> 33

atgtttactc tgaccgatga cgagcggcg attcgcgaca ctgcccgcga cttcgcggcc	60
gagcatctgg cgcccaacgc agtggagtgg gatcagacca agcattccc ggtggacgta	120
ctccgttaagg cggcgccct gggatgggc ggtatctaca ttctgtgagga cgtggcgcc	180
agttagtctga gccgcgtcga cgctgcccgg atcttcgaag agctggccaa gggcgatccg	240
tctatcgccg cgtacatctc catccacaac atggtcacgt ggatgtatcga ccagttcgcc	300
aacgacgaac agcgccacaa gtgggtcccc ggactctgtc cgtatggatca actgggcagc	360
tactgcctca ccgaaccgg cgctggctcc gatgtcgccg gcttgagcac caaggccgtt	420
cgtgacggcg acgactacat cctcaacggc gtcaaacagt tcatttcgg cgcaaggcact	480
tccgacgtgt acgtcgtat ggcacgcacc ggatctgccc gtgcggagg gatctcgccg	540
ttcatcgatc ccaaggattc gcccggactg tcgttcgggtc ccaacgaggt caagatgggc	600
tggAACGCGC agcccaccccg tcaggtgatc ttcaagacg tgcggatcc tgccgccaac	660
atgctcggtg aagagggcag cggcttccgc atcgctatga agggtctcaa cggcgccgg	720
ctgaacatcg ccgcctgctc ggtcggtgg gcccaggcag cgctggagaa ggcagtcgca	780
tatctgggtt accgcaaaagc tttcggttcg gcactgatcg agtcgcaggc cctgcagttc	840
cagctcgccg acatgcgtac cgaactcgaa gcggccagga cggtgctgtg ggcggccgct	900
gccgcactcg aagacggagc gtccgacgtc gtggagttgt gtgcgtatggc caagcgcttt	960
gccaccgaca ccgggttcga cgtagccaac aaggctctcc agcttcacgg cgggtacggc	1020
tatcttgctg agtacggat cgagaagatc gtccgcgtatc ttctgggtca tcagatcctc	1080
gaaggcagca acgagatcat gagggtggtc atcgcgcaaa gcgtggtcgc atcaggtcag	1140

	gaaaaagcaag gagcagcatg a	1161
	<210> 34	
	<211> 1578	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	<400> 34	
	atgaatgaaa tcgatgagaa aaatcaggcc cccgtgcaac aagaatgcct gaaagagatg	60
	attcagaatg ggcatgctcg gcgtatggaa tctgttgaag atctgtatgt tgctctcaac	120
	agacaaaact tatatcgaaa cttctgcaca tatggagaat tgagtgatta ctgtactagg	180
	gatcagctca cattagcttt gaggaaatc tgccctaaaa atccaactct tttacatatt	240
	gttctaccaa caagatggcc aaatcatgaa aattattatc gcagttccga atactattca	300
	cggccacatc cagtgcata ttatatttca gtattacaag aattgaaact gagtggtgtg	360
	gttctcaatg aacaacctga gtacagtgc gtaatgaagc aaatattaga agaattcaaa	420
	aatagtaagg gttcctatac tgcaaaaatt tttaaactta ctaccacttt gactattcct	480
	tactttggac caacaggacc gagttggcg ctaatttgc ttccagaaga gcacacagaa	540
	aagtggaaaa aatttatctt tgtatcta catgcata ctgatggcg gtcttcgatc	600
	cacttttttc atgatthaag agacgaatta aataatatta aaactccacc aaaaaaatta	660
	gattacattt tcaagtacga ggaggattac caattattga ggaaacttcc agaaccgatc	720
	gaaaaggta tagactttag accaccgtac ttgtttattc cgaagtcact tcttcgggt	780
	ttcatctaca atcatttgag atttcttca aaaggtgtct gtatgagaat ggatgatgt	840
	aaaaaaaccc atgatgttgt caccgagatc atcaatattt caccaacaga atttcaagcg	900
	ataaaagcaa atattaaatc aaatatccaa ggtaagtgtt ctatcactcc gtttttacat	960
	gtttgttggg ttgtatctt tcataaatgg ggttttttt tcaaaccatt gaacttcgaa	1020
	tggcttacgg atattttat ccccgcat tgccgctcac aactaccaga tgatgatgaa	1080
	atgagacaga tgtacagata tggcgctaac gttggattt ttgacttcac cccctggata	1140
	agcgaattt acatgaatga taacaaagaa aattttggc cacttattga gcactaccat	1200
	gaagtaattt cgaaagctt aagaaataaa aagcatctcc atggcttagg gttcaatata	1260
	caaggcttcg ttcaaaaata tgtgaacatt gacaaggtaa tgtgcgtatcg tgccatcg	1320
	aaaagacgcg gaggtacatt gttaaagcaat gtaggtctgt ttaatcagtt agaggagccc	1380
	gatgccaaat attctatatg cgatttggca tttggccat ttcaaggatc ctggcaccaa	1440
	gcattttcct tgggtgtttg ttgcactaat gtaaaggaa tgaatattgt tggcttca	1500
	acaaagaatg ttgttggtag tcaagaatct ctgcagagc tttgctccat ttacaaagct	1560
	ctcccttttag gcccttag	1578

ES 2 689 477 T3

<210> 35
<211> 525
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

5

<400> 35
Met Asn Glu Ile Asp Glu Lys Asn Gln Ala Pro Val Gln Gln Glu Cys
1 5 10 15

Leu Lys Glu Met Ile Gln Asn Gly His Ala Arg Arg Met Gly Ser Val
20 25 30

Glu Asp Leu Tyr Val Ala Leu Asn Arg Gln Asn Leu Tyr Arg Asn Phe
35 40 45

Cys Thr Tyr Gly Glu Leu Ser Asp Tyr Cys Thr Arg Asp Gln Leu Thr
50 55 60

Leu Ala Leu Arg Glu Ile Cys Leu Lys Asn Pro Thr Leu Leu His Ile
65 70 75 80

Val Leu Pro Thr Arg Trp Pro Asn His Glu Asn Tyr Tyr Arg Ser Ser
85 90 95

Glu Tyr Tyr Ser Arg Pro His Pro Val His Asp Tyr Ile Ser Val Leu
100 105 110

Gln Glu Leu Lys Leu Ser Gly Val Val Leu Asn Glu Gln Pro Glu Tyr
115 120 125

Ser Ala Val Met Lys Gln Ile Leu Glu Glu Phe Lys Asn Ser Lys Gly
130 135 140

Ser Tyr Thr Ala Lys Ile Phe Lys Leu Thr Thr Thr Leu Thr Ile Pro
145 150 155 160

Tyr Phe Gly Pro Thr Gly Pro Ser Trp Arg Leu Ile Cys Leu Pro Glu
165 170 175

Glu His Thr Glu Lys Trp Lys Lys Phe Ile Phe Val Ser Asn His Cys
180 185 190

Met Ser Asp Gly Arg Ser Ser Ile His Phe Phe His Asp Leu Arg Asp
195 200 205

Glu Leu Asn Asn Ile Lys Thr Pro Pro Lys Lys Leu Asp Tyr Ile Phe
210 215 220

ES 2 689 477 T3

Lys Tyr Glu Glu Asp Tyr Gln Leu Leu Arg Lys Leu Pro Glu Pro Ile
225 230 235 240

Glu Lys Val Ile Asp Phe Arg Pro Pro Tyr Leu Phe Ile Pro Lys Ser
245 250 255

Leu Leu Ser Gly Phe Ile Tyr Asn His Leu Arg Phe Ser Ser Lys Gly
260 265 270

Val Cys Met Arg Met Asp Asp Val Glu Lys Thr Asp Asp Val Val Thr
275 280 285

Glu Ile Ile Asn Ile Ser Pro Thr Glu Phe Gln Ala Ile Lys Ala Asn
290 295 300

Ile Lys Ser Asn Ile Gln Gly Lys Cys Thr Ile Thr Pro Phe Leu His
305 310 315 320

Val Cys Trp Phe Val Ser Leu His Lys Trp Gly Lys Phe Phe Lys Pro
325 330 335

Leu Asn Phe Glu Trp Leu Thr Asp Ile Phe Ile Pro Ala Asp Cys Arg
340 345 350

Ser Gln Leu Pro Asp Asp Asp Glu Met Arg Gln Met Tyr Arg Tyr Gly
355 360 365

Ala Asn Val Gly Phe Ile Asp Phe Thr Pro Trp Ile Ser Glu Phe Asp
370 375 380

Met Asn Asp Asn Lys Glu Asn Phe Trp Pro Leu Ile Glu His Tyr His
385 390 395 400

Glu Val Ile Ser Glu Ala Leu Arg Asn Lys Lys His Leu His Gly Leu
405 410 415

Gly Phe Asn Ile Gln Gly Phe Val Gln Lys Tyr Val Asn Ile Asp Lys
420 425 430

Val Met Cys Asp Arg Ala Ile Gly Lys Arg Arg Gly Gly Thr Leu Leu
435 440 445

Ser Asn Val Gly Leu Phe Asn Gln Leu Glu Glu Pro Asp Ala Lys Tyr
450 455 460

Ser Ile Cys Asp Leu Ala Phe Gly Gln Phe Gln Gly Ser Trp His Gln

ES 2 689 477 T3

465

470

475

480

Ala Phe Ser Leu Gly Val Cys Ser Thr Asn Val Lys Gly Met Asn Ile
 485 490 495

Val Val Ala Ser Thr Lys Asn Val Val Gly Ser Gln Glu Ser Leu Glu
 500 505 510

Glu Leu Cys Ser Ile Tyr Lys Ala Leu Leu Leu Gly Pro
 515 520 525

<210> 36

<211> 1608

5 <212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 36

atggaaggata tagaaggata cgaaccacat atcactcaag agttgataga ccgtggccat	60
gcaagacgta tgggccactt ggaaaactac tttgctgttt tgagttagca gaaaatgtac	120
tgcgaatttta ctgtttacgc ggaattgaat aaaggtgtta ataagagaca actaatgctt	180
gtcttgaaag tattactca aaaatactca actcttgcgc atacaatcat tcctaagcat	240
tatcctcattc atgaagcgta ctactcttagc gaagagtacc ttagtaaacc tttccacag	300
catgatttca taaaggtgat ttctcatctt gaattcgatg acttgattat gaataatcaa	360
ccagaataca gagaagtcat ggagaaaatc tcagaacagt tcaaaaagga tgatttcaaa	420
gtcaccaata ggttaatcga attgattagc cctgtaatca tacctctggg taatccgaag	480
aggcctaatt ggagattgat ttgtttacca ggtaaggata ctgatgggtt taaaacgtgg	540
aaaaacttcg tttatgtcac taaccactgc ggctccgacg gtgtcagtgg atcgaatttt	600
ttcaaaagatt tagctctact ctttgtaaa atcgaagaaa aagggtttga ttatgtgaa	660
gagttcatcg aagatcaagt catcattgac tatgatcgag actacactga aatttctaaa	720
ttgccaaaac cgattacgga tcgtattgac tacaagccag cattgacttc attacccaaa	780
ttctttttaa caaccttcat ttatgaacat tgtaattta aaacctccag cgaatctaca	840
cttacagcta gatataccc ctctagtaat gctaatgcta gttacaatta cttgttgcac	900
ttcagttacta agcaagtaga acaaattcaga gctcagatca agaaaaatgt tcacgatgg	960
tgcaccctaa cacccttcat tcaagcgtgc tttctttag ccctgtatag actggataag	1020
ctgttcacaa aatctttct cgagtatggg ttgcgtgtgg ctattccaag caacgcaaga	1080
aggtttttac caaacgatga agagttaaga gattttata aatacggttc caacggttgg	1140
ggttcgcatt acgccttatct aatctcctca ttgcacattc ccgaagggtga caatgacaag	1200
ttttggagtc ttgtcgaata ctactatgac cgcttttag aatcgatcgca caacgggtgac	1260

ES 2 689 477 T3

cacttgattg	gtctgggggt	cctacaacctt	gattttatcg	ttgaaaacaa	gaatataagac	1320										
agccttcttg	ccaactctta	tttgcaccag	caaagaggcg	gtgcaatcat	cagtaataca	1380										
ggacttgtct	cgcaagatac	gaccaagccg	tactacgttc	gggatttaat	cttctcgag	1440										
tctgcaggcg	ccttgagatt	tgcgttcggc	ctaaacgttt	gctccacaaa	cgtgaatgg	1500										
atgaacatgg	acatgagcgt	ggttcagggc	actctacggg	atcgtggcga	atgggaatcg	1560										
ttctgcaagc	tcttctacca	aaccatcgcc	gaatttgcgt	cgctttaa		1608										
<210> 37																
<211> 535																
<212> PRT																
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>																
<400> 37																
Met	Glu	Asp	Ile	Glu	Gly	Tyr	Glu	Pro	His	Ile	Thr	Gln	Glu	Leu	Ile	
1				5					10						15	
Asp Arg Gly His Ala Arg Arg Met Gly His Leu Glu Asn Tyr Phe Ala																
20				25										30		
Val Leu Ser Arg Gln Lys Met Tyr Ser Asn Phe Thr Val Tyr Ala Glu																
35				40										45		
Leu Asn Lys Gly Val Asn Lys Arg Gln Leu Met Leu Val Leu Lys Val																
50				55										60		
Leu Leu Gln Lys Tyr Ser Thr Leu Ala His Thr Ile Ile Pro Lys His																
65				70					75					80		
Tyr Pro His His Glu Ala Tyr Tyr Ser Ser Glu Glu Tyr Leu Ser Lys																
85				90										95		
Pro Phe Pro Gln His Asp Phe Ile Lys Val Ile Ser His Leu Glu Phe																
100				105										110		
Asp Asp Leu Ile Met Asn Asn Gln Pro Glu Tyr Arg Glu Val Met Glu																
115				120										125		
Lys Ile Ser Glu Gln Phe Lys Lys Asp Asp Phe Lys Val Thr Asn Arg																
130				135										140		
Leu Ile Glu Leu Ile Ser Pro Val Ile Ile Pro Leu Gly Asn Pro Lys																
145				150					155					160		
Arg Pro Asn Trp Arg Leu Ile Cys Leu Pro Gly Lys Asp Thr Asp Gly																
165				170										175		

ES 2 689 477 T3

Phe Glu Thr Trp Lys Asn Phe Val Tyr Val Thr Asn His Cys Gly Ser
180 185 190

Asp Gly Val Ser Gly Ser Asn Phe Phe Lys Asp Leu Ala Leu Leu Phe
195 200 205

Cys Lys Ile Glu Glu Lys Gly Phe Asp Tyr Asp Glu Glu Phe Ile Glu
210 215 220

Asp Gln Val Ile Ile Asp Tyr Asp Arg Asp Tyr Thr Glu Ile Ser Lys
225 230 235 240

Leu Pro Lys Pro Ile Thr Asp Arg Ile Asp Tyr Lys Pro Ala Leu Thr
245 250 255

Ser Leu Pro Lys Phe Phe Leu Thr Thr Phe Ile Tyr Glu His Cys Asn
260 265 270

Phe Lys Thr Ser Ser Glu Ser Thr Leu Thr Ala Arg Tyr Ser Pro Ser
275 280 285

Ser Asn Ala Asn Ala Ser Tyr Asn Tyr Leu Leu His Phe Ser Thr Lys
290 295 300

Gln Val Glu Gln Ile Arg Ala Gln Ile Lys Lys Asn Val His Asp Gly
305 310 315 320

Cys Thr Leu Thr Pro Phe Ile Gln Ala Cys Phe Leu Val Ala Leu Tyr
325 330 335

Arg Leu Asp Lys Leu Phe Thr Lys Ser Leu Leu Glu Tyr Gly Phe Asp
340 345 350

Val Ala Ile Pro Ser Asn Ala Arg Arg Phe Leu Pro Asn Asp Glu Glu
355 360 365

Leu Arg Asp Ser Tyr Lys Tyr Gly Ser Asn Val Gly Gly Ser His Tyr
370 375 380

Ala Tyr Leu Ile Ser Ser Phe Asp Ile Pro Glu Gly Asp Asn Asp Lys
385 390 395 400

Phe Trp Ser Leu Val Glu Tyr Tyr Asp Arg Phe Leu Glu Ser Tyr
405 410 415

Asp Asn Gly Asp His Leu Ile Gly Leu Gly Val Leu Gln Leu Asp Phe
420 425 430

ES 2 689 477 T3

Ile Val Glu Asn Lys Asn Ile Asp Ser Leu Leu Ala Asn Ser Tyr Leu
435 440 445

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

Gln Asp Thr Thr Lys Pro Tyr Tyr Val Arg Asp Leu Ile Phe Ser Gln
465 470 475 480

Ser Ala Gly Ala Leu Arg Phe Ala Phe Gly Leu Asn Val Cys Ser Thr
485 490 495

Asn Val Asn Gly Met Asn Met Asp Met Ser Val Val Gln Gly Thr Leu
500 505 510

Arg Asp Arg Gly Glu Trp Glu Ser Phe Cys Lys Leu Phe Tyr Gln Thr
515 520 525

Ile Gly Glu Phe Ala Ser Leu
530 535

REIVINDICACIONES

1. Método para producir éster del ácido metacrílico que comprende:
 - 5 una etapa de producir metacrilil-CoA a partir de isobutiril-CoA o 3-hidroxiisobutiril-CoA, y una etapa de sintetizar éster del ácido metacrílico provocando que un alcohol o fenol que tiene la fórmula R-OH actúe sobre metacrilil-CoA en presencia de una alcohol aciltransferasa, en la que R representa un grupo hidrocarbonado C1-20 lineal o ramificado de un tipo no cíclico saturado o insaturado o de un tipo cíclico saturado o insaturado.
 - 10 2. Método para producir éster del ácido metacrílico según la reivindicación 1, en el que el éster del ácido metacrílico se acumula en al menos 0,001 mM.
 - 15 3. Método para producir éster del ácido metacrílico según la reivindicación 1 o 2, en el que la isobutiril-CoA se produce a partir de ácido 2-oxoisovalérico.
 - 20 4. Método para producir éster del ácido metacrílico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la alcohol aciltransferasa es de origen vegetal.
 5. Método para producir éster del ácido metacrílico según la reivindicación 4, en el que la planta pertenece a cualquier orden seleccionado del grupo que consiste en Zingiberales, Rosales, Ericales, Cucurbitales, Brassicales y Laurales.
 - 25 6. Método para producir éster del ácido metacrílico según la reivindicación 4, en el que la planta pertenece a cualquier familia seleccionada del grupo que consiste en Musaceae, Rosaceae, Ericaceae, Actinidiaceae, Cucurbitaceae, Caricaceae y Lauraceae.
 - 30 7. Método para producir éster del ácido metacrílico según la reivindicación 4, en el que la planta pertenece a cualquier género seleccionado del grupo que consiste en *Musa*, *Fragaria*, *Malus*, *Prunus*, *Pyrus*, *Vaccinium*, *Actinidia*, *Cucumis*, *Carica* y *Persea*.
 - 35 8. Método para producir éster del ácido metacrílico según la reivindicación 4, en el que la planta es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en plátano, fresa, manzana, *Prunus mume*, *Pyrus communis*, arándano, kiwi, melón, papaya y aguacate.
 9. Método para producir éster del ácido metacrílico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, usando un microorganismo modificado genéticamente al que se le ha transferido un gen para expresar alcohol aciltransferasa.
 - 40 10. Método para producir éster del ácido metacrílico según la reivindicación 9, usando un microorganismo que pertenece al género *Rhodococcus* como microorganismo modificado genéticamente al que se le ha transferido un gen para expresar alcohol aciltransferasa.

FIG.1

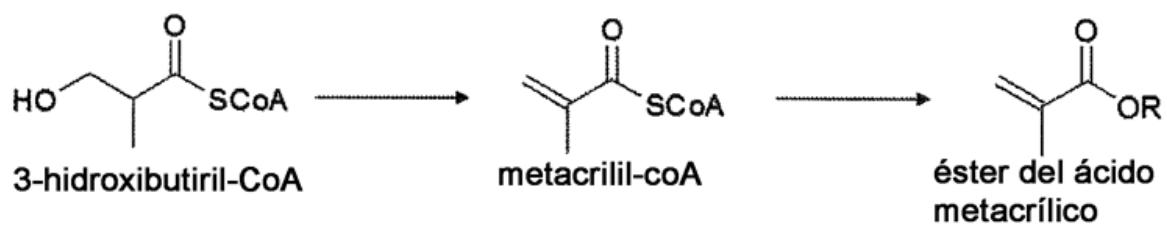


FIG.2

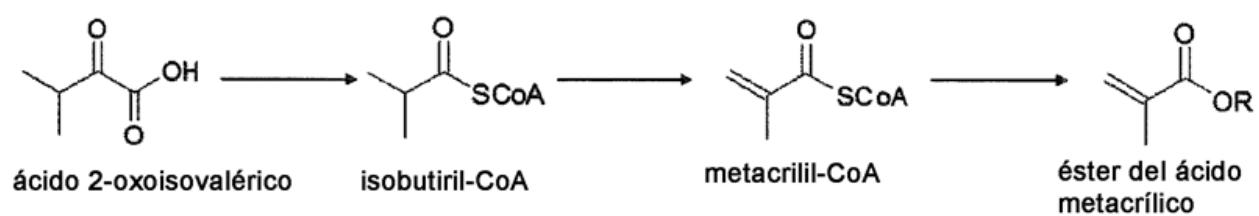


FIG.3

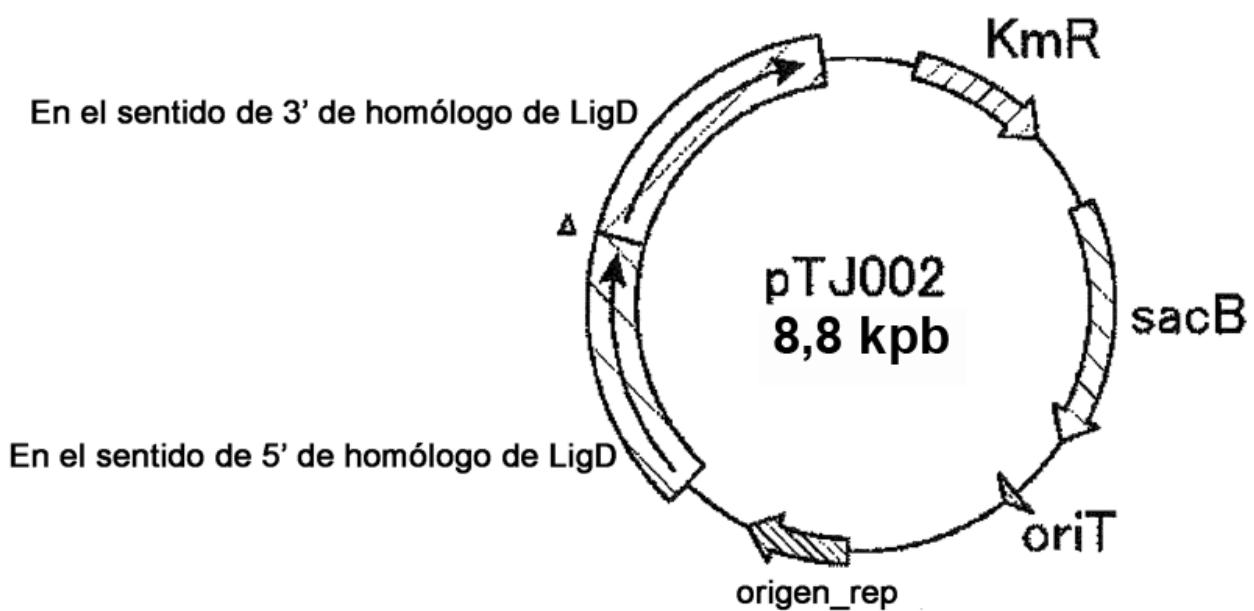


FIG.4

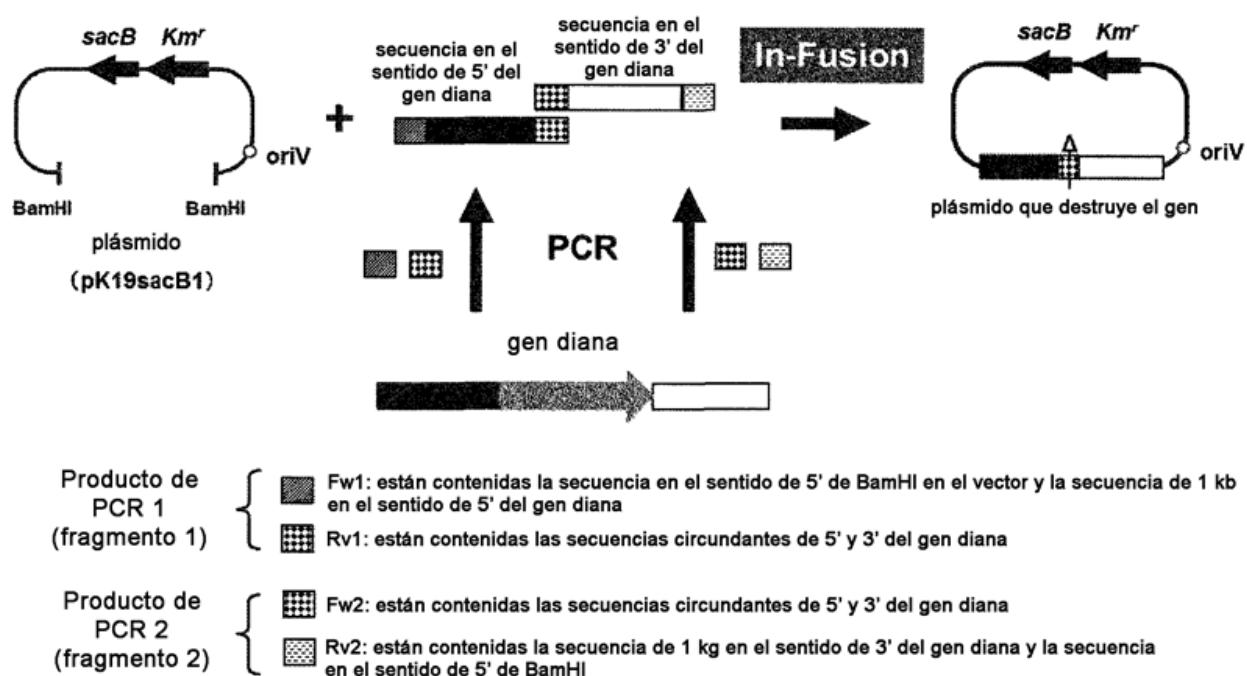


FIG.5

