

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

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.

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.

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.

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.

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 maneja 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.

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.

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

[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

[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

[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

[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

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

[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

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

Divulgación de la invención

Problemas que van a solucionarse mediante la invención

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

Medios para solucionar los problemas

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.

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, 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.

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.

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.

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*.

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*.

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

10 A continuación en el presente documento, se explicarán modos preferidos para llevar a cabo la presente invención 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 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-etilhexilo; un grupo bencilo o un grupo fenilo.

25 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO-R}$ (Fórmula 1)

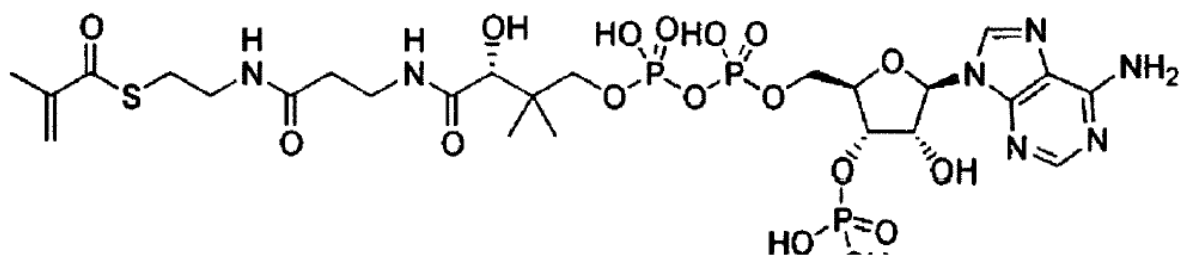
“Ácido metacrílico” (nombre IUPAC: ácido 2-metil-2-propenoico) indica un compuesto que tiene la fórmula a continuación, y también incluye cualquier sal o forma ionizada del mismo. Como sales de ácido metacrílico, por ejemplo, pueden ejemplificarse sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, sales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

30 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOH}$

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 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 Musaceae, Rosaceae, Ericaceae, 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 *Cocos* 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 pyraister* 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 oxycoccos* 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 aurantifolia*, *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 aislarse 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*, *Rhodoferrax*, *Variovorax*, *Polaromonas*, *Acidovorax*, *Verminephrobacter*, *Herminiimonas*, *Herbaspirillum*, *Collimonas*, *Chromobacterium*, *Laribacter*, *Pseudogulbenkiania*, *Nitrosomonas*, *Nitrosospora*, *Aromatoleum*, *Azoarcus*, *Dechloromonas*, *Thauera*, *Azospira* (*Dechlorosoma*), *Rheinheimera*, *Nitrosococcus*, *Halorhodospira*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Rhodanobacter*, *Francisella*, *Cycloclasticus*, *Oceanospirillum*, *Hahella*, *Halomonas*, *Alcanivorax*, *Kangiella*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Alishewanella*, *Alteromonas*, *Glaciecola*, *Marinobacter*, *Marinobacterium*, *Saccharophagus*, *Shewanella*, *Ferrimonas*, *Idiomarina*, *Colwellia*, *Pseudoalteromonas*, *Listonella*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, *Oceanimonas*, *Salinisphaera*, *Legionella*, *Coxiella*, *Desulfococcus*, *Desulfobacterium*, *Desulfatibacillum*, *Desulfobulbus*, *Desulfarculus*, *Geobacter*, *Syntrophobacter*, *Syntrophus*, *Desulfomonile*, *Bdellovibrio*, *Bacteriovorax*, *Stigmatella*, *Myxococcus*, *Anaeromyxobacter*, *Sorangium*, *Haliangium*, *Acidobacterium*, *Granulicella*, *Ilumatobacter*, *Streptosporangium*, *Nocardiosis*, *Thermobifida*, *Thermomonospora*, *Pseudonocardia*, *Amycolatopsis*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Thermobispora*, *Actinosynnema*, *Micromonospora*, *Salinispora*, *Verrucosipora*, *Nocardioidea*, *Kribbella*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia*, *Mycobacterium*, *Amycolicoccus*, *Tsukamurella*, *Segniliparus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Citricoccus*, *Renibacterium*, *Kocuria*, *Kytococcus*, *Cellulomonas*, *Intrasporangium*, *Serinicoccus*, *Frankia*, *Acidothermus*, *Nakamurella*, *Geodermatophilus*, *Stackebrandtia*, *Streptomyces*, *Catenulispora*, *Rubrobacter*, *Conexibacter*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Oceanobacillus*, *Lysinibacillus*, *Halobacillus*, *Alicyclobacillus*, *Kyripidia*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Clostridium*, *Alkaliphilus*, *Syntrophomonas*, *Syntrophothermus*, *Eubacterium*, *Desulfotobacterium*, *Desulfotomaculum*, *Pelotomaculum*, *Butyrivibrio*, *Roseburia*, *Oscillibacter*, *Thermoanaerobacter*, *Carboxydothermus*, *Natranaerobius*, *Sphingobacterium*, *Pedobacter*, *Haliscamenobacter*, *Porphyromonas*, *Odoribacter*, *Spirosoma*, *Runella*, *Maribacter*, *Deinococcus*, *Thermus*, *Meiothermus*, *Oceanithermus*, *Marinithermus*, *Gemmatimonas*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Roseiflexus*, *Herpetosiphon*, *Thermomicrobium*, *Thermotoga*, *Thermosiphon*, *Fervidobacterium*, *Deferribacter*, *Calditerrivibrio*, *Flexistipes*, *Metallosphaera*, *Aeropyrum*, *Pyrobaculum*, *Caldivirga*, *Vulcanisaeta*, *Acidilobus*, *Haloarcula*, *Haloquadratum*, *Natronomonas*, *Halorubrum*, *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Halalkalicoccus*, *Haloquadratum*, *Thermoplasma*, *Picrophilus*, *Ferroplasma*, *Archaeoglobus*, *Ferroglobus*, *Polymorphum*, *Micavibrio*, *Simiduia*, *Leptothrix*, *Thiomonas*, *Rubrivivax*, *Methylobium*, *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 clorofenolicum* 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 *Phenyllobacterium zucineum* como el microorganismo clasificado como *Phenyllobacterium*; 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 melloti*, *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 gallinifaecis*, *Ochrobactrum grignonense*, *Ochrobactrum haemophilum*, *Ochrobactrum intermedium*, *Ochrobactrum lupini*, *Ochrobactrum oryzae*, *Ochrobactrum pseudointermedium*, *Ochrobactrum pseudogrignonense*, *Ochrobactrum tirofenivorans* 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 plurifarum*, *Mesorhizobium huakuii*, *Mesorhizobium septentrionale*, *Mesorhizobium shangrilense*, *Mesorhizobium tarimense*, *Mesorhizobium temperatum*, *Mesorhizobium tioganeticu* 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 vietnamiensis*, *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 methanophila*, *Achromobacter pestifer*, *Achromobacter piechaudi*, *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 odontotermite*, *Comamonas terrae*, *Comamonas terrigena*, *Comamonas testosteroni*, *Comamonas tiooxidans* y *Comamonas zongliani* como el microorganismo clasificado como *Comamonas*; es particularmente preferible *Alicyclophilus denitrificans* como el microorganismo clasificado como *Alicyclophilus*; 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 *Rhodoferrax ferrireducens* como el microorganismo clasificado como *Rhodoferrax*; 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 *Herminephrobacter arsenicoxidans* como el microorganismo clasificado como *Herminephrobacter*; 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 *Nitrospira multiformis* como el microorganismo clasificado como *Nitrospira*; es particularmente preferible *Aromatoleum aromaticum* como el microorganismo clasificado como *Aromatoleum*; es particularmente preferible *Decloromonas aromatica* como el microorganismo clasificado como *Decloromonas*; 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 oceani* 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 zancles* 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 amygdali* 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 alysi*, *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 *Alishewanella jeotgali* como el microorganismo clasificado como *Alishewanella*; 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 hydrocarbonoclasticus*, *Marinobacter adhaerens*, *Marinobacter algicola* y *Marinobacter manganoxydans* 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 canadensis*, *Shewanella chilikensis*, *Shewanella colwelliana*, *Shewanella corallii*, *Shewanella decolorationis*, *Shewanella denitrificans*, *Shewanella donghaensis*, *Shewanella fidelis*, *Shewanella fodinae*, *Shewanella frigidimarina*, *Shewanella gaetbuli*, *Shewanella gelidimarina*, *Shewanella glacialipiscicola*, *Shewanella gopherii*,

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*,
5 *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 xiamenensis*
como el microorganismo clasificado como *Shewanella*; es particularmente preferible *Ferrimonas balearica* como el
microorganismo clasificado como *Ferrimonas*; son particularmente preferibles *Idiomarina loihiensis* e *Idiomarina*
10 *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
Pseudoalteromonas; son particularmente preferibles *Listonella anguillara*, *Listonella anguillarum* y *Listonella pelagia*
como el microorganismo clasificado como *Listonella*; son particularmente preferibles *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio*
15 *vulnificus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio tubiashii*, *Vibrio sinaloensis*, *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio orientalis*, *Vibrio*
harveyi, *Vibrio corallilyticus*, *Vibrio caribbenticus*, *Vibrio brasiliensis* y *Vibrio alginolyticus* como el microorganismo
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*
20 *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
25 preferible *Desulfatibacillum alkenivorans* como el microorganismo clasificado como *Desulfatibacillum*; es
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 bemidjiensis* como el
microorganismo clasificado como *Geobacter*; es particularmente preferible *Syntrophobacter fumaroxidans* como el
30 microorganismo clasificado como *Syntrophobacter*; es particularmente preferible *Syntrophus aciditrophicus* como el
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
35 *Stigmatella aurantiaca* como el microorganismo clasificado como *Stigmatella*; son particularmente preferibles
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
40 *Haliangium*; es particularmente preferible *Acidobacterium capsulatum* como el microorganismo clasificado como
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 *Nocardioopsis dassonvillei* como el microorganismo clasificado
45 como *Nocardioopsis*; es particularmente preferible *Thermobifida fusca* como el microorganismo clasificado como
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*
50 *xinjiangensis* como el microorganismo clasificado como *Saccharomonospora*; son particularmente preferibles
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
55 *Micromonospora*; son particularmente preferibles *Salinispora tropica* y *Salinispora arenicola* como el microorganismo
clasificado como *Salinispora*; es particularmente preferible *Verrucosipora maris* como el microorganismo clasificado
como *Verrucosipora*; es particularmente preferible *Kribbella flavida* como el microorganismo clasificado como
Kribbella; son particularmente preferibles *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium urealyticum* y
Corynebacterium kroppenstedtii como el microorganismo clasificado como *Corynebacterium*; son particularmente
60 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*,
Rhodococcus globerulus, *Rhodococcus chlorofenicus*, *Rhodococcus luteus*, *Rhodococcus aichiensis*,
Rhodococcus chubuensis, *Rhodococcus maris* y *Rhodococcus fascines* como el microorganismo clasificado como
65 *Rhodococcus*; son particularmente preferibles *Gordonia bronchialis*, *Gordonia neofelifaecis* 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*,

Mycobacterium bovis, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Mycobacterium gilvum*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium massiliense*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium thermoresistibile*, *Mycobacterium tusciae*, *Mycobacterium xenopi* y *Mycobacterium rhodesiae* como el microorganismo clasificado como *Mycobacterium*; es particularmente preferible *Amycolobicoccus subflavus* como el microorganismo clasificado como *Amycolobicoccus*; 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 profundus* 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 bingchengensis*, *Streptomyces chartreusis*, *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces coelicoflavus*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces ghanaensis*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces roseosporus*, *Streptomyces scabiei*, *Streptomyces svaceus*, *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 woesei* 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 caldohydrolyticus*, *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 *Kyrpidia tusci* como el microorganismo clasificado como *Kyrpidia*; son particularmente preferibles *Paenibacillus polymyxa*, *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 kluyveri*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium difficile* y *Clostridium sticklandii* como el microorganismo clasificado como *Clostridium*; son particularmente preferibles *Alkaliphilus metalliredigens* 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 *Desulfotobacterium hafniense* como el microorganismo clasificado como *Desulfotobacterium*; es particularmente preferible *Desulfotomaculum reducens* como el microorganismo clasificado como *Desulfotomaculum*; es particularmente preferible *Pelotomaculum thermopropionicum* como el microorganismo clasificado como *Pelotomaculum*; es particularmente preferible *Butyrivibrio proteoclasticus* 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 *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* como el microorganismo clasificado como *Carboxydotherrmus*; 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 mizutai*, *Sphingobacterium nematocida*, *Sphingobacterium piscium*, *Sphingobacterium shayense*, *Sphingobacterium siyangense*, *Sphingobacterium*

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 *Gemmatimonas aurantiaca* como el microorganismo clasificado como *Gemmatimonas*; 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 *Thermomicrobium roseum* como el microorganismo clasificado como *Thermomicrobium*; 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 caldifontis* 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 *Metilium petroleiphilum* como el microorganismo clasificado como *Metilium*; y es particularmente preferible *Anaerococcus prevotii* como el microorganismo clasificado como *Anaerococcus*.

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

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.

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.

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, formiato 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 málico, 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 chloroferolicus*, *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 IGTS8, *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.

15 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.

25 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.

30 (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, deleccionando o insertando la totalidad del gen o parte de la secuencia de nucleótidos.

35 (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.

40 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)

50 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.

55 (2-2) Acil-CoA deshidrogenasa (ACD)

60 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 IGTS8, *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.

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 %.

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 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.

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.

(3) Preparación de un microorganismo recombinante

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.

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).

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.

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.

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 lipofección, el método de transferencia por conjugación y similares.

Método para producir éster del ácido metacrílico

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.

"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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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 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.

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.

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 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 (3) Recuperación de éster del ácido metacrílico

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

ejemplos.

Ejemplo 1: Síntesis de metacrilato de isobutilo

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

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

Detección: 250 °C FID

Volumen de inyección: 150 µl

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.

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.

[Tabla 2]

Cantidad generada de metacrilato de butilo

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

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.

[Tabla 3]

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.

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

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)

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

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

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

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

Composición de la disolución de reacción

Agua esterilizada 22 µl

2 × PrimeSTAR (fabricado por Takara Bio) 25 µl

Cebador directo 1 µl

Cebador inverso 1 µl

ADN genómico 1 µl

Cantidad total 50 µl

Ciclo de temperatura

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

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 µl de agua estéril.

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.

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.

Tras cultivar, se inocularon 100 µl de medio de cultivo en agar nutriente LBamp (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 nutriente durante la noche a 37 °C en 1,5 ml de medio de cultivo LBamp

(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).

5 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).

10 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.

15 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

25 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

35 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

45 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

55 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.

60 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

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.

[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

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.

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.

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.

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

[Tabla 9]

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

Condiciones de análisis de HPLC

Dispositivo: Waters 2695

Columna: Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 5 µm

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

Velocidad de flujo: 0,25 ml/min

Temperatura de la columna: 35 °C

Detección: UV 210 nm

Volumen de inyección: 10 µl

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

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

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

Se inoculó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (NBRC106052) hecha crecer en agar nutriente 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 centrifuga 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).

(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 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.

Cebador de oligonucleótido

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

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

Composición de la disolución de reacción

Agua esterilizada 22 µl

2 × PrimeSTAR (fabricado por Takara Bio) 25 µl

MMA-003 (SEQ ID NO. 13) 1 µl

MMA-004 (SEQ ID NO. 14) 1 µl

ADN genómico 1 µl

Cantidad total 50 µl

Ciclo de temperatura

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

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 NcoI (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 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 producto de amplificación de PCR mediante incubación durante 12 horas a 16 °C.

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.

Tras cultivar, se inocularon 200 µl de medios de cultivo en agar nutriente LBamp (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 nutriente durante la noche a 37 °C en 1,5 ml de medio de cultivo LBamp (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, 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 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 modificado genéticamente para ACD

(1) Reacción de síntesis de metacrilil-CoA con isobutiril-CoA como sustrato mediante extracto libre de células recombinantes modificado 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.

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-butilico 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-butilico, 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 nutriente 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 centrifuga 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'-GGCCTGCAGGTTTCAGCTGTTTCAAAGTTCAGCGC-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.

(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

- 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.

- 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

- 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

- 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

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)

MAA-16: 5'-CGGCCCTGCAGGTTTCGCGGAATCAGATGTGC-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

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

A 0,7 ml de una disolución que contenía concentraciones finales de $MgCl_2$ 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

Fase móvil: MeOH al 35 %, H_3PO_4 50 mM, pH 5,7

Velocidad de flujo: 1,0 ml/min

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)

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

A 0,6 ml de una disolución que contenía concentraciones finales de $MgCl_2$ 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.

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

Se modificó *Rhodococcus erthropolis* 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.

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 %, KH_2PO_4 al 0,2 %, K_2HPO_4 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.

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 nutriente 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 %, KH_2PO_4 al 0,2 %, K_2HPO_4 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 nutriente 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.

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

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

GB-138: 5'-GGCCTGCAGGTACCGATCATCACCATCGGTGTC-3' (SEQ ID NO. 19)

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

Composición de la disolución de reacción

Agua esterilizada 22 μl

2 \times PrimeSTAR (fabricado por Takara Bio) 25 μl

GB-138 (SEQ ID NO. 19) 1 μl

GB-139 (SEQ ID NO. 20) 1 μl

Genoma de PR4KS (50 ng/ μl) 1 μl

Cantidad total 50 μl

Ciclo de temperatura

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

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)

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
- 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.

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

(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.

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.

65 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 SpeI. 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 SpeI. 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 SpeI. El plásmido en el que se insertó el ligador SpeI, 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).

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.

35 Cebadores para el fragmento 1

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

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

Cebadores para el fragmento 2

45 MMA-063: CACTTTCCTCACACTCGTCGAGAGTATGAG (SEQ ID NO. 25)

MMA-064: CGGTACCCGGGGATCAGCGCGACGAACAACGAGAC (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

55 Cebador Fw (20 μ M) 1 μ l

Cebador Rv (20 μ M) 1 μ l

Agua desionizada 22 μ l

60 Cantidad total 50 μ l

Ciclo de temperatura

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

65

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.

(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.

Composición de la disolución de reacción

5 × premezcla de enzima In-Fusion HD 2 µl

Fragmento de vector 1,5 µl

Fragmento de ADN 1 1 µl

Fragmento de ADN 2 2 µl

Agua desionizada 3,5 µl

Cantidad total 10 µl

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 nutriente LB que contenía sulfato de kanamicina 50 mg/l (a continuación en el presente documento, agar nutriente 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.

(3) Preparación de cepa derivada recombinante homóloga de la cepa derivada PR4KSΔligD y cepa derivada deficiente en el gen

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 nutriente LB que contenía sulfato de kanamicina 10 mg/l (a continuación en el presente documento, agar nutriente 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 nutriente 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.

Cebadores

MMA-069: GCGCATCTACAAGGAAGAGATC (SEQ ID NO. 27)

MMA-070: GCGACGCTCATCGAGATCTC (SEQ ID NO. 28)

Composición de la disolución de reacción

Molde 4,0 µl

2 × tampón Mighty Amp (fabricado por Takara) 5,0 µl

Cebador Fw (20 µm) 0,25 µl

Cebador Rv (20 µm) 0,25 µl

Agua desionizada 0,3 µl

ADN polimerasa Mighty Amp (fabricado por Takara) 0,2 µl

Total 10,0 µl

Ciclo de temperatura

30 ciclos de reacción a 98 °C 10 segundos, y 68 °C 180 segundos

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_acdI, RE_echA, RE_hchA y RE_mmsB se habían deletado de la cepa derivada PR4KSA Δ ligD, y se denominó cepa DMA008.

Ejemplo 18: Preparación de plásmido para la coexpresión de ACD y AAT en microorganismo que pertenece al género *Rhodococcus*

Se preparó un plásmido para expresar ACD y/o AAT en microorganismos que pertenecen al género *Rhodococcus*.

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.

Se realizó la amplificación del fragmento de “promotor de nitrilasa + gen de MpAAT1” tal como sigue.

Cebadores

MMA-133 (Sse-ProFw): TGACCTGCAGGTGCACTCCGCTGCGACATGTATCGA (SEQ ID NO. 29)

MMA-131 (Sse-001Rv): ACTCTAGCCTGCAGGTCATTGACTAGTTGATCTAAGGTTGTTACA (SEQ ID NO. 30)

Composición de la reacción PCR

Molde (pAAT301) 1 µl

2 × premezcla PrimeSTAR Max (fabricado por Takara) 10 µl

Cebador Fw (10 µM) 0,6 µl

Cebador Rv (10 µM) 0,6 µl

Agua desionizada 7,8 µl

Total 20 µl

Ciclo de temperatura

30 ciclos de reacción a 98 °C 5 segundos, 60 °C 5 segundos y 72 °C 45 segundos

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.

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

Fragmento amplificado por PCR 40 µl

10xM tampón 5 µl

BSA al 0,1 % 4 µl

Sse8387I (fabricado por Takara) 1 µl

Total 50 µl

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

pMMA401 (vector) 3 µl

5 10xM tampón 4 µl

BSA al 0,1 % 4 µl

AP 1 µl

10 Sse8387I (fabricado por Promega) 1 µl

Agua desionizada 27 µl

15 Total 40 µl

Composición de la reacción de ligación

pMMA401 1 µl

20 Fragmento de inserto 2 µl

Mezcla de ligación (fabricado por Takara) 3 µl

25 Total 6 µl

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

[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

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.

Composición de la disolución de reacción

DO630 = 10 células bacterianas (concentración final)

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

Alcohol (concentración final) 50 mM

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

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

[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

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

[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

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

10 <150> documento JP2013-170404
<151> 20-08-2013

15 <160> 37

<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 5 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 ctcaagaaac aaagtttctc tcagatattg acgaccaaga aagcttgaga	120
gttcagattc caatcataat gtgttacaaa gacaaccctt cacttaataa aaatcgtaat	180
cccgttaagg caattaggga agccttaagt agagcattag tgtattacta ccccttagct	240
ggaaggctta ggaagggcc taatagaaag ctcgtggtcg attgcaatgg tgaaggatc	300
ttgttcgttg aggcttctgc tgatgtcaca cttgagcaac taggagacaa aattctaccc	360
ccttgtccac ttttagagga gttcttatat aattttccag gctctgatgg aattattgat	420
tgtcctttgc tgctgattca ggtgacctgt cttacatgtg gaggtttcat acttgcatg	480
cgcctaaacc acacaatgtg tgatgcagct ggattgctct tgttcctgac cgccatcgcg	540
gagatggcaa gaggcgcaca tgcaccatct attctaccag tgtgggagag agagctcttg	600
ttcgctcgag atccaccaag aattacatgt gctcatcacg aatatgaaga cgtgattggt	660
cattctgatg gctcatcgc atccagtaac cagtcaaaca tggttcaacg atctttctac	720
tttggtgcc aaggagatgag agtccttcga aaacagattc caccacacct aatttccact	780
tgctccacat ttgacttgat cacagcttgt ttgtggaaat gtcgcactct tgcacttaac	840
attaatccaa aagaggctgt tcgagtttca tgcattgtca atgcacgagg aaagcacaac	900
aatgtacgtc ttcccttggg atactatggc aatgcatttg catttccagc tgcaatttgc	960
aaggctgaac ctctatgcaa aaatccactg ggatatgctt tggagttggt gaagaaggct	1020
aaagctacca tgaatgaaga atacttaaga tcagtggcag atcttttggg actaagaggg	1080
cgacctcaat attcatcgac aggaagttat ttaatagttt ctgataatac gcgtgtaggt	1140
tttgagatg tcaatttttg atggggacag ccggtatttg ctggaccctg caaggccttg	1200

ES 2 689 477 T3

gatttgatta gcttctacgt tcaacacaaa aacaacacag aggatggaat attggtacca 1260
atgtgtttgc catcctcggc catggagaga tttcagcagg aactagagag gattactcag 1320
gaacctaagg aggatatatg taacaacctt 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 Leu 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 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

ES 2 689 477 T3

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

5

<400> 4
 atgaacaaaa ttgaggtcag tataaattcc aaacacacca tcaaaccatc aacttcctct 60
 acaccacttc agccttacia gcttaccctc ctggaccagc tcactcctcc ggcgtatgtc 120
 cccatcgtgt tcttctaccc cattactgac catgacttca atcttcctca aaccctagct 180
 gacttaagac aagccctttc ggagactctc actttgtact atccactctc tggaaggggtc 240
 aaaaacaacc tatacatcga tgattttgaa gaaggtgtcc cataccttga ggctcgagtgc 300
 aattgtgaca tgactgattt tctaaggctt cggaaaatcg agtgccttaa tgagtttggt 360
 ccaataaaac catttagtat ggaagcaata tctgatgagc gttaccctt gcttggagtt 420
 caagtcaacg ttttcgattc tggaatagca atcgggtgtct ccgtctctca caagctcatc 480
 gatggaggaa cggcagactg ttttctcaag tcctgggggtg ctgttttttcg aggggtgtcgt 540
 gaaaatatca tacatcctag tctctctgaa gcagcattgc ttttcccacc gagagatgac 600
 ttgcctgaaa agtatgtcga tcagatggaa gcgttatggg ttgccggaaa aaaagttgct 660
 acaaggagat ttgtatttgg tgtgaaagcc atatcttcaa ttcaagatga agcgaagagc 720
 gagtccgtgc ccaagccatc acgagttcat gccgtcactg gttttctctg gaaacatcta 780
 atcgtctgctt ctcgggcact aacatcaggt actacttcaa caagactttc tatagcggcc 840
 caggcagtga acttaagaac acggatgaac atggagacag tggtggataa tgccactgga 900
 aacttgttct ggtgggcaca ggccatacta gagctaagtc atacaacacc agagatcagt 960
 gatcttaagc tgtgtgactt ggttaacttg ctcaatggat ctgtcaaaca atgtaacggg 1020
 gattactttg agactttcaa gggtaaagag ggatatggaa gaatgtgcga gtatctagat 1080
 tttcagagga ctatgagttc tatggaacca gcaccggata tttatttatt ctcgagctgg 1140
 actaattttt tcaaccctcact tgatttttga tgggggagga catcatggat tggagttgca 1200
 ggaaaaattg aatctgcaag ttgcaagttc ataattattg ttccaacaca atgcgggttct 1260
 ggaattgaag cgtgggtgaa tctagaagaa gagaaaatgg ctatgctaga acaagatccc 1320
 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	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	Leu	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	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

<213> *Fragaria vesca* (VAAT)

<400> 6

atgaacaaaa ttgagggtcag tataatttcc aaacacacca tcaaaccatc aacttcctct

60

ES 2 689 477 T3

```

tcaccacttc agccttacaa gcttaccctg ctcgaccagc tcaactcctcc atcgatatgtc 120
cccatggtat tcttctaccc cattactggc cctgcagtct tcaatcttca aaccctagct 180
gacttaagac atgccctttc cgagactctc actttgtact atccactctc tggaaggggc 240
aaaaacaacc tatacatcga tgattttgaa gaggggtgtcc cataccttga ggctcgagtgc 300
aactgtgaca tgaatgattt tctaaggctt ccgaaaatcg agtgcctaaa tgagtttggt 360
ccaataaaac catttagtat ggaagcaata tctgatgagc gttacccttt gctcggagt 420
caagttaaca ttttcaactc cggaatagca atcgggggtct ccgtctctca caagctcatc 480
gatggaagaa cttcagactg ttttctcaag tcgtggtgtg ctgtttttcg tggttctcgt 540
gacaaaatca tacatcctaa tctctctcaa gcagcattgc ttttcccacc aagagatgac 600
ttgcctgaaa agtatgcccg tcagatggaa gggttatggt ttgtcggaaa aaaagttgct 660
acaaggagat ttgtatttgg tgcgaaagcc atatctgtaa ttcaagatga agcaaagagc 720
gagtccgtgc ccaagccatc acgagttcag gctgtcacta gttttctctg gaaacatcta 780
atcgctactt ctcggggcact aacatcaggt actacttcaa caagactttc tatagcaacc 840
caggtagtga acataagatc acggaggaac atggagacag tgtgggataa tgccattgga 900
aacttgatat gggtcgtctc ggccatacta gagctaagtc atacaacact agagatcagt 960
gatcttaagc tgtgtgactt ggtaacttg ctcaatggat ctgtcaaaca atgtaacgggt 1020
gattactttg agactttcat gggtaaagag ggatatggaa gcatgtgcga gtatctagat 1080
tttcagagga ctatgagttc tatggaacca gcaccagaga tttatttatt cacgagctgg 1140
actaatTTTT tcaaccaact tgattttgga tgggggagga catcatggat tggagttgca 1200
ggaaaaattg aatctgcatt ttgcaatctc acaacattag ttccaacacc atgcgatact 1260
ggaattgaag cgtgggtgaa tctagaagaa gaaaaaatgg ctatgctaga acaagatccc 1320
cagtttctag cactagcatc tccaaagacg ctaatttcaa gatattga 1368

```

<210> 7

<211> 387

<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				5					10					15	

Arg	Ala	Phe	Ala	Arg	His	Glu	Leu	Ala	Pro	Lys	Ala	Ala	Asp	Trp	Asp
			20					25					30		

Arg	Asp	His	His	Phe	Pro	Val	Glu	Val	Ile	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln
		35					40					45			

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

<212> ADN

<213> *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (acd1)

<400> 8

atggatttcg acctcaccga agaacaacgc ctgctggtgg agagcgcccg cgccttcgcc	60
cgccacgaac tggcgccgaa ggcgggccgac tgggaccgcg accatcactt cccggtggaa	120
gtcatccgcg ccgcccgcga acagggctac ctcggcctgt acatcgccga ggaagacggc	180
ggcctggggc tgtcgcggt gtccacttcg ctgatcttcg agcaactggc cgccggctgc	240
gtggccacta ccgcctacat cagcatccac aacatggccg cctggatgct cgccctcgttc	300
ggcgacgcgg cgctgaagga ggcttggtg cccggcctga tcggcggcga gtcgctcgcc	360
tcctattgcc tgaccgagcc cgatgccggc tccgacgccg cgcgccctgc caccgcgcc	420
cgccgcgagg gcgacgaata cgtgctggac ggagcaagt gcttcatttc cggcgccggc	480
agcaccaggg tgctgatcgt catggcgcg accggcgagg acggcgccag gggcatctcc	540
tgcttcctgg taccggccga cgcgcccggc atccgctacg gccgcaacga ggacaagatg	600
ggctggcgcg cgagccgac ccgcaccatc accttcgaag gcgtgcgcat ccccgccggc	660
aaccgcatcg gcccggagg ccaaggcttc gtctatgcca tgaaaggcct cgacggcggc	720
cgcctgaaca tcgccagttg ttccctgggc gccgcccagg cggcgctgga gcagtcgatg	780
cgctacgtcg aggagcgcg gcagttcggc aagccgctgg cgacctcca ggccttgacg	840
ttcaagctcg ccgacatgct caccgaactc accgccagcc gccagatggt ccgcctcggc	900
gcccacggc tggaccgcg cgacgccgag gcgaccctgt actgcgcaat ggccaagcgc	960

ES 2 689 477 T3

ttcgccaccg accgctgctt cgatgtctgc aacgaggcct tgcaactgca cggcggctac 1020
 ggctatctca acgattatcc gctggagcgc tgggtacgcg acaccgcgt gcaccagatc 1080
 ctcgaaggca ccaacgaaat catgcgggtg atcgtcgccc gccgcctgct ggagcagggc 1140
 ggcattgctcg atcgctgct gtga 1164

<210> 9

<211> 258

5 <212> PRT

<213> *Rhodococcus erythropolis* 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 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 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

<212> ADN

<213> *Rhodococcus erythropolis* PR4 (RE_echA)

<400> 10

gtgaccgact tcaacacccat catcctcgag cgtaaggggtc gcgtcggcgt catcacgctc 60

aaccgcccga aggctctcaa cgccctgaac tccgagctga tgaacgaggt cgtcgccgcg 120

gttgccgacc tcgaagcgga caacggcatc ggagccatcc tgatcaccgg ttccgagcgc 180

gccttcgccg ccggcgccga catcaaggaa atgcagtcca agacgtacat ggacgcatac 240

gtcgaagatt tcttcacccc gtgggaccgc gtcgcagccg ctgtaagcc gctgatcgcc 300

gccgtctccg ggtacgcgct cgggtggtggc tgcgaactgg cgatgctctg cgatttcac 360

atcgcttcgg ataccgcgaa gttcggccag cccgagatca agctcgggtgt cattccgggt 420

atcgggtggct cacagcgcct tacgcgcgcc gtgggtaagg ccaaggccat ggagctgtgc 480

ctgaccggcc gcaacatgga cgcagaagag gccgagcgcg caggcctggt tgcccggatc 540

gttccggccg ccgatctgct cgacgacgca ttgaagaccg caaccacccat cgccgagatg 600

tcgctgcccga tcgcgatgat ggccaaggaa gcggtcaacc gttccttcga gaccacactc 660

gccgagggcg tccgcttcga gcgtcgggtg ttccactcga ccttcgcgac ggaggatcag 720

aaggaaggca tgaccgcgtt cgtggagaag cgggtccgccg agttcaagca ccgctga 777

<210> 11

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MMA-044

<400> 11

gtttgcacgc ctgccgttcg acg

<210> 12

<211> 23

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> MMA-0045	
	<400> 12	
	cggtacgcg gcgatctcca gag	23
10	<210> 13	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> MMA-003	
	<400> 13	
20	gacccatgga ttctgacctc accgaagaac	30
	<210> 14	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> MMA-004	
	<400> 14	
30	gccctgcagg atgcgatggt tcgcgcggtt c	31
	<210> 15	
	<211> 31	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> MMA-031	
40	<400> 15	
	ggctatgacc gactcaaca ccatcatcct c	31
	<210> 16	
	<211> 34	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> MMA-032	
50	<400> 16	
	ggcctgcagg ttcagctgtt cgaaagtca gcgc	34
	<210> 17	
55	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> MAA-15	
	<400> 17	
	ggcctgtcat gaggattac gagccg	26
65	<210> 18	
	<211> 32	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> MAA-16	
	<400> 18	
	cggccctgca ggctcgcgga aatcagatgt gc	32
10	<210> 19	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> GB-138	
	<400> 19	
20	ggcctgcagg taccgatcat caccatcggt gtc	33
	<210> 20	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> GB-139	
	<400> 20	
30	ggtctagact gagcagtggt ccaatgcg	28
	<210> 21	
	<211> 31	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> GB-140	
40	<400> 21	
	gaggaaatgg tcacagggcg agaataagggt g	31
	<210> 22	
	<211> 29	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> GB-141	
50	<400> 22	
	gccctgtgac catttctca ttgtgctgg	29
	<210> 23	
55	<211> 35	
	<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	
	<220>	
5	<223> MMA-062	
	<400> 24	
	agtgtgagga aagtgtccg atcagttcat	30
10	<210> 25	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> MMA-063	
	<400> 25	
20	cactttcctc acactcgtcg agagtatgag	30
	<210> 26	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> MMA-064	
	<400> 26	
30	cggtacccgg ggatcagcgc gacgaacaac gagac	35
	<210> 27	
	<211> 22	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> MMA-069	
40	<400> 27	
	gcgcatctac aaggaagaga tc	22
	<210> 28	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> MMA-070	
50	<400> 28	
	gcgacgctca tcgagatctc	20
	<210> 29	
55	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> MMA-133	
	<400> 29	
	tgacctgcag gtgcactccg ctgcgacatg tatcga	36
65	<210> 30	
	<211> 45	

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> MMA-131

<400> 30
actctagcct gcaggtcatt gactagtga tctaagggtg ttaca

45

<210> 31
<211> 1520
<212> ADN
<213> *Rhodococcus erythropolis* PR4

<400> 31
tcaacggaga gtttgatcct ggctcaggac gaacgctggc ggcgtgctta acacatgcaa 60
gtcgaagcggc aaggcctttc ggggtacacg agcggcgaac gggtagtaaa cacgtgggtg 120
atctgccctg cacttcggga taagcctggg aaactgggtc taataccgga tatgacctca 180
ggttgcatga cttgggggtg aaagatttat cgggtgcagga tgggcccgcg gcctatcagc 240
ttgttggtgg ggtaatggcc taccaaggcg acgacgggta gccgacctga gagggtgacc 300
ggccacactg ggactgagac acggcccaga ctcctacggg aggcagcagt ggggaatatt 360
gcacaatggg cgaaagcctg atgcagcgac gccgcgtgag ggatgacggc cttcgggttg 420

taaacctctt tcagcagga cgaagcgcaa gtgacggtag ctgcagaaga agcaccggct 480
aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggggtgcaag cggtgtccgg aattactggg 540
cgtaaagagt tcgtaggcgg tttgtcgcgt cgtttgtgaa aaccagcagc tcaactgctg 600
gcttgcagggc gatacgggca gacttgagta ctgcagggga gactggaatt cctgggtgtag 660
cgggtgaaatg cgcagatatc aggaggaaca ccgggtggcga aggcgggtct ctgggcagta 720
actgacgctg aggaacgaaa gcgtgggtag cgaacaggat tagataccct ggtagtccac 780
gccgtaaacg gtgggcgcta ggtgtgggtt ccttccacgg aatccgtgcc gtagctaacg 840
cattaagcgc cccgcctggg gactacggcc gcaaggctaa aactcaaagg aattgacggg 900
ggccccgaca agcggcggag catgtggatt aattcgatgc aacgcgaaga accttacctg 960
ggtttgacat ataccgaaa gctgcagaga tgtggcccc cttgtgggtcg gtatacaggt 1020
gggtgcatggc tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc 1080
aaccctatc ttatgttgcc agcacgttat ggtggggact cgtaagagac tgccggggtc 1140
aactcggagg aaggtgggga cgacgtcaag tcatcatgcc cttatgtcc agggcttcac 1200
acatgctaca atggccagta cagagggctg cgagaccgtg aggtggagcg aatcccttaa 1260
agctggtctc agttcggatc ggggtctgca actcgacccc gtgaagtcgg agtcgctagt 1320
aatcgcagat cagcaacgct gcggtgaata cgttcccggg cttgtacac accgcccgtc 1380
acgtcatgaa agtcggtaac acccgaagcc ggtggcttaa ccccttgtgg gagggagccg 1440
tcgaaggtgg gatcggcgat tgggacgaag tcgtaacaag gtagccgtac cggaaggtgc 1500
ggctggatca cctcctttct 1520

<210> 32

<211> 386

<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 Leu Gly
35 40 45

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

Arg Val Asp Ala Ala Arg Ile Phe Glu Glu Leu 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

<212> ADN

<213> *Rhodococcus erythropolis* PR4 RE_Acd1

<400> 33

atgtttactc tgaccgatga cgagcgggcg attcgcgaca ctgcccgcga cttcgcggcc	60
gagcatctgg cgcccaacgc agtggagtgg gatcagacca agcatttccc ggtggacgtc	120
ctccgtaagg cggcgtccct ggggatgggc ggtatctaca ttcgtgagga cgtgggcggc	180
agtgagctga gccgcgtcga cgctgcccgg atcttcgaag agctggccaa gggcgatccg	240
tcgatcgccg cgtacatctc catccacaac atgggtcacgt ggatgatcga ccagttcggc	300
aacgacgaac agcgccacaa gtgggtcccc ggactctgct cgatggatca actgggcagc	360
tactgcctca ccgaacccgg cgctgggtcc gatgctgcgg gcttgagcac caaggccggt	420
cgtgacggcg acgactacat cctcaacggc gtcaaacagt tcatttccgg cgcaggcact	480
tccgacgtgt acgtcgtgat ggcacgcacc ggatctgccg gtgccaaggg gatctcggcg	540
ttcatcgtgc ccaaggattc gcccgactg tcgttcggtg ccaacgaggt caagatgggc	600
tggaacgcgc agcccacccg tcaggtgatc ttcgaagacg tgcgagttcc tgccgccaac	660
atgctcggtg aagagggcag cggcttccgc atcgctatga aggtctcaa cggcggccgg	720
ctgaacatcg ccgcctgctc ggtcgggtgg gcccaggcag cgctggagaa ggcagtcgca	780
tatctgggtg accgcaaagc tttcggttcg gcactgatcg agtcgcaggc cctgcagttc	840
cagctcgccg acatgcgtac cgaactcgaa gcggccagga cgttgctgtg gcgcgccgct	900
gccgcactcg aagacggagc gtccgacgtc gtggagtgtg gtgcgatggc caagcgcttt	960
gccaccgaca ccgggttcga cgtagccaac aaggctctcc agcttcacgg cgggtacggc	1020
tatcttgctg agtacgggat cgagaagatc gtccgcgatc ttcgggttca tcagatcctc	1080
gaaggcagca acgagatcat gaggtggtc atcgcgcgaa gcgtgggtcgc atcaggtcag	1140

ggaaagcaag gagcagcatg a 1161

<210> 34

<211> 1578

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 34

atgaatgaaa tcgatgagaa aaatcaggcc cccgtgcaac aagaatgcct gaaagagatg	60
attcagaatg ggcattgctcg gcgtatggga tctgttgaag atctgtatgt tgctctcaac	120
agacaaaact tatatcgaaa cttctgcaca tatggagaat tgagtgatta ctgtactagg	180
gatcagctca cattagcttt gagggaaatc tgcctgaaaa atccaactct ttacatatt	240
gttctaccaa caagatggcc aaatcatgaa aattattatc gcagttccga atactattca	300
cggccacatc cagtgcattg ttatatattca gtattacaag aattgaaact gagtggtgtg	360
gttctcaatg aacaacctga gtacagtgcg gtaattgaagc aaatattaga agaattcaaa	420
aatagtaagg gttcctatac tgcaaaaatt tttaaactta ctaccacttt gactattcct	480
tactttggac caacaggacc gagttggcgg ctaatttgct ttcagaaga gcacacagaa	540
aagtggaaaa aatttatctt tgtatctaatt cattgcatgt ctgatggctg gtcttcgatc	600
cacttttttc atgatttaag agacgaatta aataatatta aaactccacc aaaaaatta	660
gattacattt tcaagtacga ggaggattac caattattga ggaaacttcc agaaccgatc	720
gaaaagggtg tagactttag accaccgtac ttgtttattc cgaagtcact tctttcgggt	780
ttcatctaca atcatttgag attttcttca aaagggtgtc gtatgagaat ggatgatgtg	840
gaaaaaaccc atgatgttgt caccgagatc atcaatattt caccaacaga atttcaagcg	900
attaaagcaa atattaaatc aaatatccaa ggtaagtgtg ctatcactcc gtttttacat	960
gtttgttggt ttgtatctct tcataaatgg ggtaaatatt tcaaaccatt gaacttcgaa	1020
tggcttacgg atatttttat ccccgcatg tgccgctcac aactaccaga tgatgatgaa	1080
atgagacaga tgtacagata tggcgctaac gttggattta ttgacttcac cccctggata	1140
agcgaatttg acatgaatga taacaaagaa aatttttggc cacttattga gcactaccat	1200
gaagtaattt cggaagcttt aagaaataaa aagcatctcc atggcttagg gttcaatata	1260
caaggcttcg ttcaaaaata tgtgaacatt gacaaggtaa tgtgcatcg tgccatcggg	1320
aaaagacgcg gaggtacatt gttaagcaat gtaggtctgt ttaatcagtt agaggagccc	1380
gatgccaaat attctatatg cgatttggca tttggccaat ttcaaggatc ctggcaccaa	1440
gcattttcct tgggtgtttg ttcgactaat gtaaagggga tgaatattgt tgttgcttca	1500
acaaagaatg ttgttggtag tcaagaatct ctcgaagagc tttgctccat ttacaaagct	1560
ctccttttag 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

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 36

```

atggaagata tagaaggata cgaaccacat atcactcaag agttgataga ccgtggccat      60
gcaagacgta tggggccactt ggaaaactac tttgctgttt tgagtaggca gaaaatgtac      120
tcgaatttta ctgtttacgc ggaattgaat aaaggtgtta ataagagaca actaatgctt      180
gtcttgaaag tattacttca aaaatactca actcttgccg atacaatcat tcctaagcat      240
tatactcatc atgaagcgta ctactctagc gaagagtacc ttagtaaacc ttttccacag      300
catgatttca taaaggtgat ttctcatctt gaattcgatg acttgattat gaataatcaa      360
ccagaataca gagaagtcac ggagaaaatc tcagaacagt tcaaaaagga tgatttcaaa      420
gtcaccaata ggtaaatcga attgattagc cctgtaatca tacctctggg taatccgaag      480
aggcctaatt ggagattgat ttgtttacca ggtaaggata ctgatgggtt tgaaacgtgg      540
aaaaacttcg tttatgtcac taaccactgc ggctccgacg gtgtcagtgg atcgaatttt      600
ttcaaagatt tagctctact cttttgtaaa atcgaagaaa aagggtttga ttatgatgaa      660
gagttcatcg aagatcaagt catcattgac tatgatcgag actacactga aatttctaaa      720
ttgccaaaac cgattacgga tcgtattgac tacaagccag cattgacttc attacccaaa      780
ttctttttta caaccttcat ttatgaacat tgtaatttta aaacctccag cgaatctaca      840
cttacagcta gatatagccc ctctagtaat gctaattgta gttacaatta cttgttgcat      900
ttcagtacta agcaagtaga acaaatcaga gctcagatca agaaaaatgt tcacgatggg      960
tgcaccctaa cacccttcat tcaagcgtgc tttcttgtag ccctgtatag actggataag     1020
ctgttcacaa aatctcttct cgagtatggg ttcgatgtgg ctattccaag caacgcaaga     1080
aggttttttac caaacgatga agagttaaga gattcttata aatacggctc caacggttga     1140
ggttcgcatt acgcctatct aatctcctca ttcgacattc ccgaaggtga caatgacaag     1200
ttttggagtc ttgtcgaata ctactatgac cgcttttttag aatcgtacga caacggtgac     1260

```

ES 2 689 477 T3

cacttgattg gtctgggggt cctacaactt gattttatcg ttgaaaacaa gaatatagac 1320
 agccttcttg ccaactctta ttgaccag caaagaggcg gtgcaatcat cagtaataca 1380
 ggacttgtct cgcaagatac gaccaagccg tactacgttc gggatttaat cttctcgcag 1440
 tctgcaggcg ccttgagatt tgcgttcggc ctaaactgtt gctccacaaa cgtgaatggt 1500
 atgaacatgg acatgagcgt gggtcagggc actctacggg atcgtggcga atgggaatcg 1560
 ttctgcaagc tcttctacca aaccatcggc gaatttgcgt cgctttaa 1608

<210> 37

<211> 535

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<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	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.
 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.
 - 15 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.
 - 20 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.
 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*.
 - 30 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.
 - 35 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

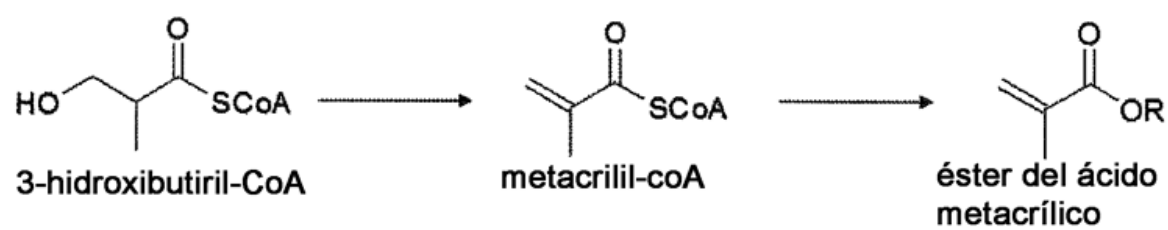


FIG.2



FIG.3

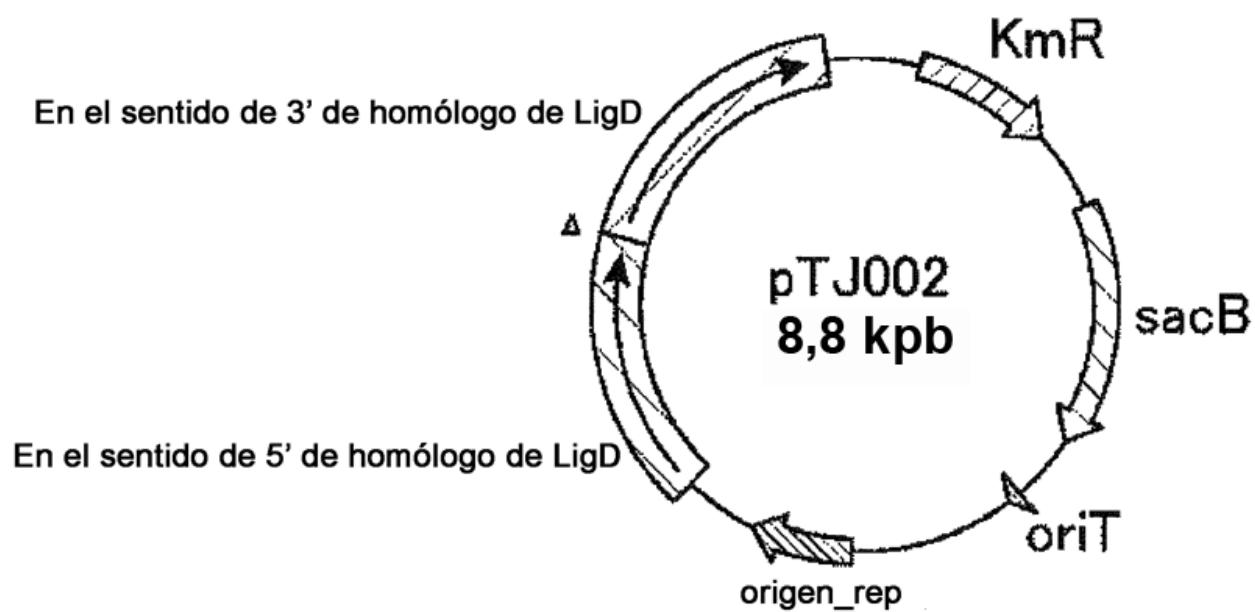


FIG.4

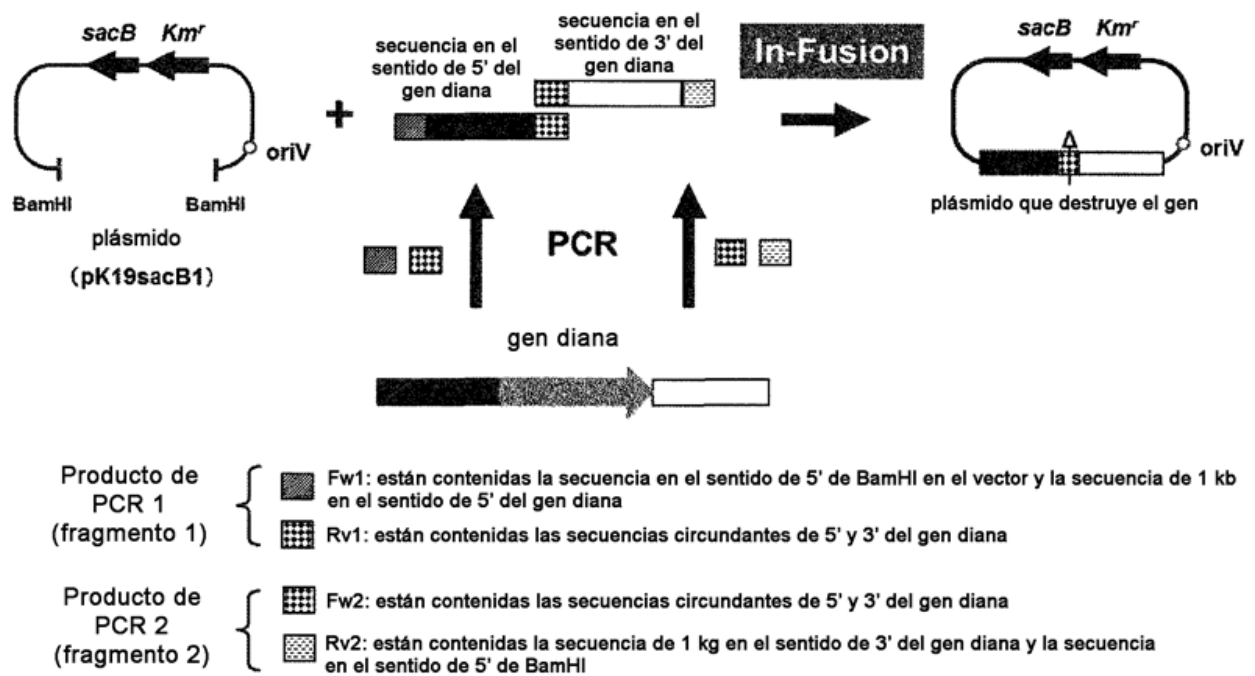


FIG.5

