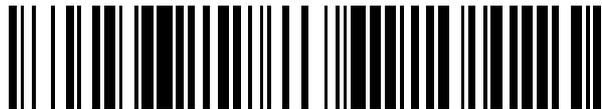


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 758**

51 Int. Cl.:

C12P 7/62 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C07C 67/343 (2006.01)

C08F 220/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2013 PCT/GB2013/051376**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13179005**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2013 E 13726259 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2855689**

54 Título: **Proceso para la producción de metacrilato de metilo**

30 Prioridad:

28.05.2012 GB 201209425

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

02.12.2019

73 Titular/es:

**LUCITE INTERNATIONAL UK LIMITED (100.0%)
Cassel Works, New Road, Billingham
TS23 1LE, GB**

72 Inventor/es:

**EASTHAM, GRAHAM, RONALD;
JOHNSON, DAVID, WILLIAM;
STRAATHOF, ADRIANUS, JOHANNES, JOZEF;
FRAAIJE, MARCO WILHELMUS y
WINTER, REMKO, TSJIBBE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 733 758 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).

en presencia de un catalizador adecuado, y opcionalmente en presencia de metanol.

En una realización particularmente preferida, el compuesto de fórmula I deriva de formaldehído en presencia de metanol y/o agua. En dicho caso, el compuesto de fórmula I se puede definir como una fuente adecuada de formaldehído.

- 5 Para evitar dudas, una fuente adecuada de formaldehído incluye cualquier composición en equilibrio que pueda proporcionar una fuente de formaldehído. Los ejemplos de dichas incluyen, pero no se limitan a, metilal (1,1-dimetoximetano), polioximetilenos $-(CH_2-O)_i-$ en donde $i = 1$ a 100, formalina (formaldehído, metanol, agua) y otras composiciones en equilibrio tales como una mezcla de formaldehído, metanol y propionato de metilo.

10 Normalmente, los polioximetilenos son formales superiores de formaldehído y metanol $CH_3-O-(CH_2-O)_i-CH_3$ ("formal-i"), en donde $i = 1$ a 100, preferentemente 1-5, especialmente 1-3, u otros polioximetilenos con al menos un grupo terminal distinto de metilo. Por tanto, la fuente de formaldehído también puede ser un polioximetileno de fórmula $R^{31}-O-(CH_2-O)-R^{32}$, donde R^{31} y R^{32} pueden ser grupos iguales o diferentes y al menos uno se selecciona de un grupo alquilo C_2-C_{10} , por ejemplo $R^{31} =$ isobutilo y $R^{32} =$ metilo.

15 Preferentemente, la fuente adecuada de formaldehído se selecciona de 1,1-dimetoximetano, formales superiores de formaldehído y metanol, $CH_3-O-(CH_2-O)_i-CH_3$ donde $i=2$, formalina o una mezcla que comprende formaldehído, metanol y propionato de metilo.

20 Preferentemente, por el término formalina se indica una mezcla de formaldehído:metanol:agua en la relación 25 a 65 %: 0,01 a 25 %: 25 a 70 % en peso. Más preferentemente, por el término formalina se indica una mezcla de formaldehído:metanol:agua en la relación 30 a 60 %: 0,03 a 20 %: 35 a 60 % en peso. Lo más preferentemente, por el término formalina se indica una mezcla de formaldehído:metanol:agua en la relación 35 a 55 %: 0,05 a 18 %: 42 a 53 % en peso.

25 Preferentemente, la mezcla que comprende formaldehído, metanol y propionato de metilo contiene menos de 5 % de agua en peso. Más preferentemente, la mezcla que comprende formaldehído, metanol y propionato de metilo contiene menos de 1 % de agua en peso. Lo más preferentemente, la mezcla que comprende formaldehído, metanol y propionato de metilo contiene 0,1 a 0,5 % de agua en peso.

30 El experto conoce catalizadores adecuados para la conversión catalítica de propionato de metilo (MEP) en MMA usando formaldehído. Un catalizador conocido es un catalizador básico tal como un catalizador de metal alcalino sobre un soporte, por ejemplo sílice, que puede incluir otros metales y compuestos metálicos. Una sílice adecuada es una sílice porosa de alta área superficial. El área superficial de la sílice puede ser al menos $30 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. El metal alcalino preferido es cesio. El metal alcalino puede estar presente a un nivel 1-10 % en peso de los catalizadores. El catalizador puede contener otros metales tales como magnesio, aluminio, hafnio, boro y/o circonio. La cantidad de otro metal es variable, pero se pueden obtener buenos resultados cuando el otro metal está presente en dicha cantidad tal que el catalizador contenga un total de 0,25 a 2 gramos de átomos de dicho elemento modificador por 100 moles de sílice.

35 Otros catalizadores adecuados incluyen óxidos metálicos mixtos ($M^1_w M^2_x O_y$) en donde M^1 es al menos un metal seleccionado del grupo 3 o 4 en los periodos 4º a 6º de la tabla periódica, grupo 13 en los periodos 3º a 5º de la tabla periódica, o los restantes elementos en la serie de los lantánidos (concretamente, escandio, itrio, los elementos lantánidos, titanio, circonio, hafnio; aluminio, galio, indio) y M^2 es al menos un metal seleccionado del grupo 5 en los periodos 5º o 6º de la tabla periódica o el grupo 15 en los periodos 4º o 5º de la tabla periódica (concretamente, niobio, tántalo, arsénico y antimonio); óxidos metálicos mixtos que contienen fósforo ($M^1_w M^2_x P_y O_z$) en donde M^1 es un metal del grupo IIb, preferentemente aluminio, y M^2 es un metal del grupo IVb, preferentemente silicio; óxidos metálicos individuales nitrados tales como el nitrato Ta_2O_5 ; óxidos metálicos mixtos nitrados ($M^1_w M^2_x N_y O_z$), en donde M^1 se selecciona de los metales del grupo 2, 3, 4, 13 (también denominado IIIA) o 14 (también denominado IVA) de la tabla periódica y M^2 se selecciona de los metales de los grupos 5 o 15 (también denominado VA); y fosfatos del grupo II tales como hidroxiapatita y ortofosfatos, particularmente hábitos cristalinos de tipo varilla o aguja de hidroxiapatita de calcio y estroncio; todos opcionalmente en presencia de un soporte adecuado tal como sílice o alumina.

40 La conversión catalítica de propionato de metilo (MEP) en MMA o MAA usando formaldehído se efectúa normalmente a una temperatura elevada, normalmente en el intervalo 250-400 °C. Si el producto deseado es un éster, la reacción se efectúa preferentemente en presencia del alcohol relevante para minimizar la formación del ácido correspondiente mediante hidrólisis del éster. También por comodidad, frecuentemente se desea introducir el formaldehído en forma de formalina. Por tanto, para la producción de metacrilato de metilo, la mezcla de reacción alimentada al catalizador generalmente consistirá en propionato de metilo, metanol, formaldehído y agua.

55 La oxidación de Baeyer-Villiger se refiere a la inserción de un átomo de oxígeno en una cetona para formar un éster. En cetonas asimétricas, esta reacción de inserción ocurre casi exclusivamente entre el carbono del carbonilo y el ion carbonio más estable de la cetona. Generalmente se conoce que la oxi-inserción de Baeyer-Villiger para cetonas no simétricas tiene el orden aproximado de migración de grupo alquilo terciario > alquilo secundario > arilo > alquilo primario > metilo (March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure 6ª Edición, pg.1619).

- 5 Por consiguiente, la oxidación de Baeyer-Villiger de 2-butanona se asociaría tradicionalmente al producto acetato de etilo. Por tanto, la oxidación de Baeyer-Villiger de 2-butanona no es una vía que el experto elegiría fácilmente como vía hacia el metacrilato de metilo mediante el propionato de metilo. Sin embargo, los inventores han encontrado que ciertas monooxigenasas de Baeyer-Villiger pueden insertar un átomo de oxígeno en 2-butanona en un modo anormal, dando el poco probable producto de propionato de metilo.
- Sorprendentemente, esto ha conducido a una vía biológica poco usual y novedosa hacia el monómero de metacrilato de metilo para la industria de los polímeros mediante azúcar y/o glicerol y/o fermentación de gases convertibles por microbios en un alcohol y su posterior oxidación en 2-butanona y, por tanto, MEP mediante la oxidación anormal de Baeyer-Villiger.
- 10 Se conoce que las enzimas oxidativas de Baeyer-Villiger son comunes a diversos organismos que incluyen bacterias, plantas, animales, arqueas y hongos. Las enzimas oxidativas de Baeyer-Villiger pueden catalizar la conversión de cetonas en ésteres. Sin embargo, solo se describe que aquellas enzimas informadas actúan en sistemas biológicos en cetonas basadas en anillo (lactonas), en vez de las cetonas alifáticas de cadena lineal. En los pocos estudios donde se ha probado su actividad en las cetonas alifáticas de cadena lineal, se informa que tienen actividad muy baja.
- 15 El término 'monooxigenasa de Baeyer-Villiger', como se usa en el presente documento, se refiere preferentemente a una enzima capaz de catalizar reacciones de oxidación que pertenecen al grupo de clasificación EC 1.14.13.X y dichas enzimas generalmente comprenden las siguientes secuencias características: dos motivos de la secuencia de proteínas plegadas de Rossmann (GxGxxG) en el extremo N y el centro de la secuencia de proteínas, respectivamente, y el motivo de unión de BVMO típico FxGxxxHxxxW[P/D] localizado en una región de bucle de la proteína plegada.
- 20 La monooxigenasa de Baeyer-Villiger puede ser una enzima natural, o una enzima modificada. Además, la enzima puede ser sintética si está de acuerdo con la natural o una modificación de la misma.
- 25 El término 'natural' se usa en el presente documento tanto con referencia a polipéptidos tales como enzimas, polinucleótidos tales como genes, organismos, células, como a cualquier otra materia que se refiera a la forma que existe de forma natural de dicha materia.
- El término 'modificado' se usa en el presente documento con referencia a polipéptidos tales como enzimas, polinucleótidos tales como genes, organismos, células, o cualquier otra materia que se refiera a dicha materia como que es diferente a la natural.
- 30 El término 'gas(es) convertible(s) por microbios', como se usa en el presente documento, significa un gas o gases que se pueden convertir por microbios en una materia prima. Un gas adecuado es un gas rico en CO y una fermentación adecuada se describe en el documento de patente US 2012/0045807A1 que convierte CO en 2,3-butanodiol usando fermentación anaerobia con Clostridia tal como *Clostridium autoethanogenum*, *Ijundahlia* and *ragdalei* en medios apropiados y en las condiciones conocidas por el experto.
- 35 Las alteraciones adecuadas a la materia natural que pueden producir materia modificada incluyen alteraciones al material genético, alteraciones al material de proteína.
- Las alteraciones al material genético pueden incluir cualquier modificación genética conocida en la técnica que convertirá el material en diferente al natural.
- 40 Los ejemplos de dichas modificaciones genéticas incluyen, pero no se limitan a: deleciones, inserciones, sustituciones, fusiones, etc., que se pueden realizar en la secuencia de polinucleótido/s que contiene el gen o genes relevantes a modificar.
- 45 Dichas modificaciones genéticas dentro del alcance de la presente invención también pueden incluir cualquier modificación epigenética adecuada. Las modificaciones epigenéticas pueden incluir cualquier modificación que afecte al material genético relevante sin modificación de la secuencia de polinucleótido/s que contiene el gen o genes relevantes a modificar. Los ejemplos de modificaciones epigenéticas incluyen, pero no se limitan a: metilación o acetilación de ácidos nucleicos, modificación de histonas, paramutación, silenciamiento de genes, etc.
- Las alteraciones al material de proteína pueden incluir cualquier modificación de proteína conocida en la técnica que convertirá el material en diferente al natural.
- 50 Los ejemplos de dichas modificaciones de proteína incluyen, pero no se limitan a: escisión de partes del polipéptido que incluye fragmentación; unión de otros grupos bioquímicamente funcionales; cambio de la naturaleza química de un aminoácido; cambio de restos de aminoácidos que incluyen sustituciones conservativas y no conservativas, deleciones, inserciones, etc.; cambio de la unión del polipéptido, etc.; que se pueden realizar en la secuencia de polipéptido/s que se pliega(n) para formar la proteína o proteínas relevantes a modificar.

Las alteraciones a la estructura de dichos materiales pueden incluir cualquier modificación estructural conocida en la técnica que convertirá la estructura de material genético o de proteína en diferente a la natural.

5 Los ejemplos de dichas modificaciones estructurales incluyen modificaciones provocadas por, pero no se limitan a, los siguientes factores: la interacción con otras estructuras; interacciones con disolventes; interacciones con sustratos, productos, cofactores, coenzimas, o cualquier otra sustancia química presente en una reacción adecuada que incluye otros polinucleótidos o polipéptidos; la creación de estructuras cuaternarias de proteína; cambio de la temperatura ambiente o pH, etc., que se pueden realizar en la(s) estructura(s) del material(es) genético(s) o de proteína relevante(s) de interés.

10 Cada una de las modificaciones detalladas en los grupos de alteración genética, alteración de proteínas o alteración estructural anteriores se dan como una ejemplificación del amplio intervalo de posibles modificaciones conocidas para el experto, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

15 Preferentemente, la enzima monooxigenasa de Baeyer-Villiger (BVMO) es una enzima natural. Más preferentemente, la enzima monooxigenasa de Baeyer-Villiger (BVMO) es una enzima natural que deriva de un organismo, en donde el organismo puede ser de cualquier dominio que incluye las arqueas, bacterias o eucariotas. Todavía más preferentemente, la enzima monooxigenasa de Baeyer-Villiger (BVMO) es una enzima natural que deriva de un organismo, en donde el organismo es del reino de las plantas, hongos, arqueas o bacterias. Todavía más preferentemente, la enzima monooxigenasa de Baeyer-Villiger (BVMO) es una enzima natural que deriva de una bacteria, o un hongo.

20 Las fuentes bacterianas adecuadas de enzimas monooxigenasas de Baeyer-Villiger (BVMO) naturales incluyen, pero no se limitan a, bacterias de los siguientes géneros bacterianos; *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Brachymonas*, *Nocardia*, *Exophiala*, *Brevibacterium*, *Gordonia*, *Novosphingobium*, *Streptomyces*, *Thermobifida*, *Xanthobacter*, *Mycobacterium*, *Comamonas*, *Thermobifida* o *Pseudomonas*. Las fuentes bacterianas preferidas de enzimas monooxigenasas de Baeyer-Villiger (BVMO) naturales son bacterias de los siguientes géneros: *Acinetobacter* o *Rhodococcus*.

25 Las fuentes fúngicas adecuadas de enzimas monooxigenasas de Baeyer-Villiger (BVMO) naturales incluyen, pero no se limitan a, hongos de los siguientes géneros fúngicos; *Gibberella*, *Aspergillus*, *Magnaporthe*, *Cylindrocarpon*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Cunninghamella*, *Cylindrocarpon* o *Schizosaccharomyces*. Las fuentes fúngicas preferidas de enzimas monooxigenasas de Baeyer-Villiger (BVMO) naturales son hongos de los siguientes géneros: *Gibberella*, *Aspergillus* o *Magnaporthe*.

30 Lo más preferentemente, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger es una enzima natural que deriva de las especies bacterianas *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 o *Rhodococcus jostii* RHA1 o *Rhodococcus* sp. HI-31 o *Xanthobacter flavus*.

35 Más preferentemente, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger es una monooxigenasa de Baeyer-Villiger de tipo I seleccionada de uno de los siguientes grupos de enzimas: una ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) número EC 1.14.13.22 (GenBank: BAA86293.1); una 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa (HAPMO) número EC 1.14.13.84 (GenBank: AAK54073.1); una ciclopentadecanona monooxigenasa (CPDMO) (GenBank: BAE93346.1).

40 Todavía más preferentemente, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger se selecciona de una de las siguientes enzimas: ciclohexanona monooxigenasa de *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871, ciclohexanona monooxigenasas de *Xanthobacter flavus* (GenBank: CAD10801.1), ciclohexanona monooxigenasas de *Rhodococcus* sp. HI-31 (GenBank: BAH56677.1), ciclohexanona monooxigenasa de *Brachymonas petroleovorans* (GenBank: AAR99068.1), 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa (SwissProt: Q93TJ5.1), o ciclopentadecanona monooxigenasa (GenBank: BAE93346.1).

45 Todavía más preferentemente, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger es un ciclohexanona monooxigenasa, que se puede seleccionar de ciclohexanona monooxigenasa de *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871, ciclohexanona monooxigenasas de *Xanthobacter flavus* (GenBank: CAD10801.1), ciclohexanona monooxigenasas de *Rhodococcus* sp. HI-31 (GenBank: BAH56677.1), o ciclohexanona monooxigenasa de *Brachymonas petroleovorans* (GenBank: AAR99068.1).

Sorprendentemente, los inventores han encontrado que las ciclohexanona monooxigenasas pueden producir propionato de metilo a una alta tasa con concentraciones de solo sustrato de 2-butanona 5 mM.

50 Por tanto, lo más preferentemente, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger es ciclohexanona monooxigenasa que deriva preferentemente de *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871, *Xanthobacter flavus* (GenBank: CAD10801.1) o *Rhodococcus* sp. HI-31 (GenBank: BAH56677.1).

55 Lo más preferentemente, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger es una enzima natural que deriva de las especies bacterianas *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 o *Rhodococcus jostii* RHA1 o *Rhodococcus* sp. HI-31 o *Xanthobacter flavus* o *Brachymonas petroleovorans*.

Además, los inventores han descubierto sorprendentemente que la 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa, y la ciclopentadecanona monooxigenasa también, pueden producir propionato de metilo a niveles industrialmente significativos.

5 Por tanto, en una realización preferida alternativa, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger es una 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa o una ciclopentadecanona monooxigenasa. Más preferentemente, una 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa (SwissProt: Q93TJ5.1) o una ciclopentadecanona monooxigenasa (GenBank: BAE93346.1).

Preferentemente, la 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa deriva de *Pseudomonas fluorescens*.

Preferentemente el ciclopentadecanona monooxigenasa deriva de ***Pseudomonas sp. HI-70***.

10 Por tanto, lo más preferentemente, la Enzima monooxigenasa de Baeyer-Villiger es una 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa de las especies bacterianas *Pseudomonas fluorescens*, o un ciclopentadecanona monooxigenasa de las especies bacterianas ***Pseudomonas sp. HI-70***.

15 Opcionalmente, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger usada en la presente invención puede estar presente como una mezcla de una o más de las enzimas monooxigenasas de Baeyer-Villiger anteriormente mencionadas. En cuyo caso, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger (BVMO) puede derivar de una cualquiera o más de las fuentes descritas anteriormente, en cualquier combinación o formulación. Por ejemplo, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger (BVMO) puede ser una mezcla de una enzima BVMO derivada de una bacteria y una enzima BVMO derivada de un hongo, donde una enzima puede ser una enzima modificada y una puede ser una enzima natural.

20 Alternativamente, en una realización adicional, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger puede estar presente como una enzima modificada. Preferentemente, la enzima BVMO modificada es una enzima genéticamente modificada en donde el material genético de la enzima BVMO ha sido alterado a partir del natural.

25 En una realización, la enzima BVMO genéticamente modificada puede ser una proteína de fusión que se ha construido a partir de partes de la secuencia genética natural de uno o más de las monooxigenasas de Baeyer-Villiger anteriormente mencionadas para crear una quimera. Los ejemplos preferidos de dichas BVMOs quiméricas incluyen, por ejemplo: PASTMO (una fusión de PAMO y STMO), o PACHMO (una fusión de PAMO y CHMO) como se describe por van Beek et al. en Chemical Communications 2012, 48, 3288-3290.

Preferentemente, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger se produce por propagación de un organismo hospedador que ha sido transformado con los ácidos nucleicos relevantes para expresar dicha monooxigenasa de Baeyer-Villiger de un modo conocido en la técnica. Los organismos hospedadores adecuados incluyen, pero no se limitan a: bacterias, hongos, levaduras, plantas, algas, protistas, etc.

30 Preferentemente, los ácidos nucleicos relevantes se expresan en un vector de expresión dentro del organismo hospedador. Los vectores de expresión adecuados incluyen cualquier vector comercialmente disponible conocido en la técnica, tales como, pero no se limitan a: fago, plásmidos, cósmidos, fagémido, fósmido, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levadura, etc.

35 Adecuadamente, el vector más apropiado, método de transformación, y todos los otros procesos asociados necesarios para la expresión de una enzima BVMO en un organismo hospedador, como se trata más adelante para bacterias, se adaptan al organismo hospedador relevante como se conoce en la técnica.

40 Preferentemente, el organismo hospedador es una bacteria. Adecuadamente, por tanto, el vector de expresión usado es cualquier plásmido comercialmente disponible, tal como, pero no se limitan a: pBR, pUC, pBS, pBE, ColE, pUT, pACYC, pA, pRAS, pTiC, pBPS, pUO, pKH, pWKS, pCD, pCA, pBAD, pBAC, pMAK, pBL, pTA, pCRE, pHT, pJB, pET, pLME, pMD, pTE, pDP, pSR, etc. Más preferentemente, el vector de expresión usado es uno de los siguientes plásmidos comercialmente disponibles: pBAD, pCREorpET.

45 Opcionalmente, el vector de expresión puede ser un vector de expresión modificado que no está comercialmente disponible y ha sido alterado de forma que se adapte a la expresión particular de una enzima BVMO dentro de un organismo hospedador. Por consiguiente, en una realización preferida, el vector de expresión usado es el plásmido pCRE2, basado en el plásmido pBAD comercial para la expresión de la enzima BVMO en una bacteria hospedadora, como se describe en Torres Pazmino et al. ChemoBioChem 10:2595-2598 (2009).

50 Preferentemente, la bacteria hospedadora se transforma por cualquier medio adecuado conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a: microinyección, ultrasonidos, métodos de congelación-descongelación, microporación o el uso de células químicamente competentes. Más preferentemente, la bacteria hospedadora se transforma por electroporación.

Las bacterias hospedadoras adecuadas incluyen las del género: *Streptomyces*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Staphylococcus* o *Vibrio*. Preferentemente, la bacteria hospedadora se selecciona del género *Escherichia*. Más preferentemente, la bacteria hospedadora es la especie *Escherichia coli*. Lo más preferentemente, la bacteria hospedadora es la cepa TOP10 de *Escherichia coli*.

- 5 Preferentemente, los ácidos nucleicos relevantes expresados en el vector de expresión son secuencias genéticas que codifican la monooxigenasa de Baeyer-Villiger más cualquier secuencia genética adicional necesaria para efectuar su expresión en una bacteria hospedadora como se conoce en la técnica, tales como, pero no se limitan a: promotores, terminadores, efectores en la dirección 3' o en la dirección 5', supresores, activadores, potenciadores, cofactores de unión, iniciadores, etc.
- 10 Preferentemente, el vector de expresión comprende además secuencias genéticas que codifican al menos un marcador de expresión. El marcador de expresión permite identificar las células bacterianas del hospedador que han sido transformadas correctamente. Los marcadores de expresión adecuados incluyen cualquiera conocido en la técnica, pero no se limitan a: un gen de resistencia antibacteriana, un gen productor de pigmentos, un gen inhibidor de pigmentos, un gen de capacidad metabólica o un gen de incapacidad metabólica. Más preferentemente, el marcador de expresión es un gen de resistencia antibacteriana. Todavía más preferentemente, el gen de resistencia antibacteriana es un gen de resistencia a ampicilina. Por consiguiente, solo las bacterias capaces de crecer en medios que contienen ampicilina expresan el vector y se han transformado correctamente.
- 15 Preferentemente, el vector de expresión comprende además secuencias genéticas que codifican al menos un activador. El activador permite estimular las células bacterianas hospedadoras que han sido transformadas para producir la enzima BVMO en los tiempos apropiados por interacción con una sustancia inductora. Los sistemas activador-inductor adecuados incluyen cualquiera conocido en la técnica, pero particularmente el operón ara donde L-arabinosa es el inductor, o el operón lac donde el inductor es alolactosa o IPTG.
- 20 Opcionalmente, el vector de expresión puede comprender además secuencias genéticas que codifican una marca. Preferentemente, las secuencias genéticas que codifican dicha marca son realizables para ser continuamente transcritas con las secuencias genéticas que codifican la enzima monooxigenasa de Baeyer-Villiger, de forma que la marca forme una proteína de fusión con la enzima monooxigenasa de Baeyer-Villiger resultante. La marca permite que la enzima monooxigenasa de Baeyer-Villiger resultante se purifique fácilmente a partir del lisado bacteriano del hospedador. Las marcas adecuadas incluyen cualquiera conocida en la técnica, pero no se limitan a: una marca His, una marca GST, una marca MBP, o una marca de anticuerpo.
- 25 Preferentemente, la bacteria hospedadora se cultiva cultivando dentro de, o sobre, un medio adecuado en condiciones adecuadas como se conocen en la técnica, en donde los medios pueden ser un caldo o un gel fijo. Preferentemente, el medio contiene una fuente de nutrientes, un componente selectivo para seleccionar la presencia del marcador de expresión y un inductor para inducir la expresión del vector de expresión en las bacterias, en donde el componente selectivo y el inductor son específicos para el vector de expresión usado. Preferentemente, el medio es un caldo. Más preferentemente, el medio es caldo de Luria-Bertani.
- 30 La monooxigenasa de Baeyer-Villiger puede estar presente en la mezcla de reacción del proceso anterior en cualquier forma adecuada conocida en la técnica, tal como, pero no se limita a: un extracto de células libres, una enzima sintética, o contenida dentro de las células del organismo hospedador, y estas últimas se pueden localizar dentro de la mezcla de reacción en cualquier forma adecuada conocida en la técnica, tales como, pero no se limitan a: en forma libre en disolución, sujetas sobre una membrana, o unidas a/dentro de una columna.
- 35 Preferentemente, la BVMO está presente en la mezcla de reacción a una concentración necesaria para producir la cantidad requerida de propionato de metilo capaz de ser producido al nivel relativo de oxígeno disuelto. Normalmente, en una situación industrial, se disuelven aproximadamente 0,01 a 0,5 moles de O₂ por litro por hora en la mezcla de reacción que es capaz de dar aproximadamente 0,01 a 0,5 moles de propionato de metilo por litro por hora.
- 40 El término 'aproximadamente' indica un límite marginal de un máximo de 20 % por encima o por debajo del valor establecido. Preferentemente, dentro de 10 % por encima o por debajo del valor establecido.
- 45 En una realización, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger está presente en la mezcla de reacción como un extracto de células de la célula en la que se expresó, en donde la célula es preferentemente la célula bacteriana hospedadora usada para producir la enzima BVMO. El extracto de células se puede obtener por cualquier medio adecuado capaz de lisar las células bacterianas hospedadoras, que incluyen, pero no se limitan a: sonicación, tratamiento con DNAsa/lisozima, tratamiento de congelación-descongelación, o tratamiento alcalino.
- 50 Preferentemente, el extracto de células se trata entonces para retirar los restos celulares antes de ser usado como una fuente de monooxigenasa de Baeyer-Villiger en el proceso anterior. El lisado celular se puede tratar por cualquier medio adecuado conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a: filtración, centrifugación o purificación con sales para obtener un extracto de células depurado.
- 55 Preferentemente, están presentes componentes adicionales en la mezcla de reacción del proceso anterior para permitir que la enzima monooxigenasa de Baeyer-Villiger funcione correctamente. Preferentemente, los componentes adicionales son: un tampón o pH stat, NADPH, y opcionalmente un agente regenerador de NADPH.

Se puede usar cualquier tampón adecuado en la mezcla de reacción, tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a: Tris-HCl, TAPS, Bicine, Tricine, TAPSO, HEPES, TES, MOPS, PIPES, cacodilato, SSC o MES. Preferentemente, el tampón usado en la mezcla de reacción es Tris-HCl.

Alternativamente, se puede usar un pH stat para controlar el pH de la mezcla de reacción.

5 Preferentemente, el tampón o el pH stat mantiene la mezcla de reacción a un pH adecuado para que la enzima BVMO funcione y/o viva el organismo hospedador que comprende dicha enzima BVMO. Preferentemente, el tampón o el pH stat mantiene la mezcla de reacción a un pH entre aproximadamente pH 6,5 y pH 8,5. Más preferentemente, el tampón o el pH stat mantiene la mezcla de reacción a un pH de entre aproximadamente pH 7,3 y 7,7. Todavía más preferentemente, el tampón o el pH stat mantiene la mezcla de reacción a un pH de aproximadamente 7,5.

10 El término 'aproximadamente', como se usa con referencia al pH de la mezcla de reacción, indica un límite marginal de un máximo de 20 % por encima o por debajo del valor establecido. Sin embargo, preferentemente el pH de la mezcla de reacción está dentro del 10 % por encima o por debajo del valor establecido.

15 Preferentemente, la concentración de tampón en la mezcla de reacción es entre aproximadamente 25 y 100 mM. Más preferentemente, la concentración de tampón en la mezcla de reacción es entre aproximadamente 40 y 60 mM. Todavía más preferentemente, la concentración de tampón en la mezcla de reacción es aproximadamente 50 mM.

El término 'aproximadamente', como se usa con referencia a la concentración de tampón, indica un límite marginal de un máximo de 20 % por encima o por debajo del valor establecido. Sin embargo, preferentemente la concentración de tampón está dentro del 10 % por encima o por debajo del valor establecido.

20 Preferentemente, NADPH está presente en la mezcla de reacción a una concentración molar inicial con respecto a BVMO de forma que la enzima BVMO se sature con NADPH. Por tanto, preferentemente NADPH está presente en la mezcla de reacción a una concentración que es al menos igual a la concentración de enzima BVMO.

25 Preferentemente, en una realización, NADPH está presente en la mezcla de reacción a una concentración inicial de entre aproximadamente 50 y 200 μ M. Más preferentemente, NADPH está presente en la mezcla de reacción a una concentración inicial de entre aproximadamente 90 y 110 μ M. Todavía más preferentemente, NADPH está presente en la mezcla de reacción a una concentración inicial de aproximadamente 100 μ M.

El término 'aproximadamente', como se usa con referencia a la concentración de NADPH, indica un límite marginal de un máximo de 20 % por encima o por debajo del valor establecido. Sin embargo, preferentemente la concentración de NADPH está dentro del 10 % por encima o por debajo del valor establecido.

30 Preferentemente, el agente regenerador de NADPH está presente en la mezcla de reacción a una concentración de entre aproximadamente 5 y 20 μ M. Más preferentemente, el agente regenerador de NADPH está presente en la mezcla de reacción a una concentración de entre aproximadamente 8 y 12 μ M. Todavía más preferentemente, el agente regenerador de NADPH está presente en la mezcla de reacción a una concentración de aproximadamente 10 μ M.

35 Preferentemente, si se usa, el agente regenerador de NADPH está presente en la mezcla de reacción a una concentración molar con respecto a BVMO de forma que la BVMO se sature con NADPH. Preferentemente, por tanto, la Km del agente regenerador de NADPH, si se usa, es al menos equivalente a la tasa de consumo de NADPH por la BVMO.

40 El término 'aproximadamente', como se usa con referencia a la concentración de agente regenerador de NADPH, indica un límite marginal de un máximo de 20 % por encima o por debajo del valor establecido. Sin embargo, preferentemente la concentración de agente regenerador de NADPH está dentro del 10 % por encima o por debajo del valor establecido.

45 Se puede usar cualquier agente regenerador de NADPH adecuado en la mezcla de reacción, tal como, pero no se limitan a: fosfito deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, o formiato deshidrogenasa. Adecuadamente, el sustrato asociado relevante para el agente regenerador de NADPH también está presente dentro de la mezcla de reacción, tal como, pero no se limita a: glucosa, un alcohol, fosfito o formiato.

Alternativamente, se puede proporcionar NADPH en la mezcla de reacción como un cofactor macromolecular ligado covalentemente a un soporte, por ejemplo una membrana, resina, o gel.

50 Preferentemente, el sustrato asociado está presente en la mezcla de reacción a una concentración de entre 5 mM y 20 mM, más preferentemente a una concentración de entre aproximadamente 8 mM y 12 mM, todavía más preferentemente a una concentración de aproximadamente 10 mM.

Preferentemente, el sustrato asociado está presente en la mezcla de reacción a una concentración molar con respecto al agente regenerador de NADPH (agente regenerador de NADPH: sustrato asociado) de entre aproximadamente 1:4000 y 1:250. Más preferentemente, el sustrato asociado está presente en la mezcla de reacción a una concentración molar con respecto al agente regenerador de NADPH de aproximadamente 1:1000.

El término 'aproximadamente', como se usa con referencia a la concentración de sustrato asociado al agente regenerador de NADPH, indica un límite marginal de un máximo de 20 % por encima o por debajo del valor establecido. Sin embargo, preferentemente la concentración de sustrato asociado al agente regenerador de NADPH está dentro del 10 % por encima o por debajo del valor establecido.

- 5 Adecuadamente, el sustrato está presente en la mezcla de reacción anterior para empezar la conversión por BVMO de 2-butanona en propionato de metilo. Preferentemente, en dicha realización, la concentración de sustrato de 2-butanona presente en la mezcla de reacción anterior es entre aproximadamente 10 g/L y 200 g/L. Más preferentemente, la concentración de sustrato de 2-butanona presente en la mezcla de reacción anterior es entre aproximadamente 50 g/L y 130 g/L. Todavía más preferentemente, la concentración de sustrato de 2-butanona presente en la mezcla de reacción anterior es entre aproximadamente 90 g/L y 110 g/L

El término 'aproximadamente', como se usa con referencia a la concentración de sustrato, indica un límite marginal de un máximo de 20 % por encima o por debajo del valor establecido. Sin embargo, preferentemente la concentración de sustrato está dentro del 10 % por encima o por debajo del valor establecido.

- 15 Preferentemente, en dicha realización, la concentración de sustrato de 2-butanona presente en la mezcla de reacción anterior es al menos aproximadamente 10 % en peso de la mezcla de reacción, más preferentemente está entre al menos aproximadamente 20 % en peso de la mezcla de reacción, hasta aproximadamente 80 % en peso de la mezcla de reacción.

- 20 En una realización alternativa, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger puede estar presente en la mezcla de reacción como una enzima sintética. En dicha realización, la enzima sintética se sintetiza *in vitro* de un modo conocido en la técnica, luego se purifica antes de ser usada en la mezcla de reacción. Preferentemente, la mezcla de reacción comprende los mismos componentes que se definen en la mezcla de reacción anteriormente a sustancialmente las mismas concentraciones y relaciones.

- 25 En una realización adicional alternativa, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger puede estar presente en la mezcla de reacción dentro de las células del organismo hospedador, tales como las células bacterianas. En dicha realización, las células hospedadoras se preparan de un modo conocido en la técnica, luego se purifican antes de ser usadas en la mezcla de reacción. Preferentemente, la mezcla de reacción comprende tampón y sustrato como se definen en la mezcla de reacción anteriormente. Preferentemente, el tampón está presente a las mismas concentraciones y relaciones definidas anteriormente.

- 30 Sin embargo, preferentemente, en dicha realización, la concentración de sustrato de 2-butanona presente en la mezcla de reacción anterior es inferior al límite de concentración que es tóxico para las células hospedadoras, y que es óptimo para la captación del sustrato en las células hospedadoras. Preferentemente, por tanto, la concentración de sustrato de 2-butanona presente en la mezcla de reacción anterior es entre aproximadamente 0,2 g/L y 50 g/L. Más preferentemente, la concentración de sustrato de 2-butanona presente en la mezcla de reacción anterior es entre aproximadamente 0,2 g/L y 30 g/L. Todavía más preferentemente, la concentración de sustrato de 2-butanona presente en la mezcla de reacción anterior es entre aproximadamente 0,2 g/L y 20 g/L.

El término 'aproximadamente', como se usa con referencia a la concentración de sustrato, indica un límite marginal de un máximo de 20 % por encima o por debajo del valor establecido. Sin embargo, preferentemente la concentración de sustrato está dentro del 10 % por encima o por debajo del valor establecido.

- 40 Preferentemente, en dicha realización, la concentración de sustrato de 2-butanona presente en la mezcla de reacción anterior es al menos aproximadamente 1 % en peso de la mezcla de reacción, más preferentemente está entre al menos aproximadamente 2 % en peso de la mezcla de reacción, hasta aproximadamente 20 % en peso de la mezcla de reacción.

- 45 Adecuadamente, en dicha realización, la concentración de enzima BVMO presente en la mezcla de reacción se determina por la concentración de células hospedadoras presentes en los medios de reacción. Preferentemente, la concentración de células hospedadoras presentes en los medios de reacción es entre aproximadamente 1 g/L y 100 g/L. Más preferentemente, la concentración de células bacterianas hospedadoras presentes en los medios de reacción es entre aproximadamente 5 g/L y 50 g/L. Todavía más preferentemente, la concentración de células bacterianas hospedadoras presentes en los medios de reacción es entre aproximadamente 10 g/L y 20 g/L. Normalmente, las células hospedadoras son células bacterianas.

- 50 Adecuadamente en dicha realización, la mezcla de reacción no comprende NADPH añadido o un agente regenerador de NADPH opcional ni sustrato asociado debido a que ya están presentes dentro de la bioquímica de la célula hospedadora.

- 55 Preferentemente, independientemente de la forma de la fuente de BVMO usada en la mezcla de reacción, se implementa un sistema de retirada de producto *in situ* junto con una estrategia de alimentación de sustrato en el proceso de reacción. Se ha encontrado que la retirada de producto junto con una alimentación de sustrato constante puede aumentar los rendimientos de producto dando valores mucho más altos, como se describe por Alphand et al. en Trends in Biotechnology Vol. 21 No. 7 July 2003. Se puede implementar cualquier sistema de retirada de

producto y cualquier estrategia de alimentación de sustrato conocida en la técnica. Sin embargo, el sistema de retirada de producto y el sistema de alimentación de sustrato se implementan preferentemente usando la misma tecnología, por ejemplo, usando un material de soporte que puede actuar simultáneamente de depósito para el sustrato y de sumidero para el producto. Dicha tecnología es el uso de la resina Optipore L-493 descrita por Simpson et al. Journal of Molecular Catalysis B Enzyme 16, pp. 101-108

Ventajosamente, los inventores han encontrado además que el uso de ciertos co-disolventes en la mezcla de reacción puede aumentar el nivel relativo y/o absoluto del producto de propionato de metilo.

El término 'nivel absoluto', como se usa en el presente documento, se refiere al valor en porcentaje real del propionato de metilo obtenido como producto en disolución de la conversión de 2-butanona. El término 'nivel relativo', como se usa en el presente documento, se refiere a la selectividad, es decir, el porcentaje de propionato de metilo obtenido como producto en disolución en comparación con el producto alternativo acetato de obtenido como producto en disolución de la conversión de 2-butanona.

Preferentemente, por tanto, al menos un co-disolvente se incluye en la mezcla de reacción anterior, co-disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, uno de los siguientes: metanol, 2-butanol, terc-butanol, dioxano, acetona o acetonitrilo.

Opcionalmente, la función del co-disolvente en la mezcla de reacción también puede ser cumplida por el sustrato 2-butanona. Por consiguiente, se puede usar exceso de 2-butanona, además del necesario para la catálisis del sustrato.

Sorprendentemente, un aumento en la concentración de sustrato, más allá de los niveles rutinariamente usados en dichas conversiones enzimáticas, aumenta la selectividad de la reacción de la BVMO para producir más inserciones anormales y más propionato de metilo con respecto al producto normal de acetato de etilo. Sorprendentemente, a concentraciones en exceso superiores a 1000 veces la concentración molar con respecto a BVMO, existe un aumento en las inserciones anormales, formación anormal de éster, por la enzima BVMO, de forma que se reduce la relación entre la producción de acetato de etilo y la producción de propionato de metilo. Por consiguiente, la concentración de co-disolvente/sustrato es a 1000:1 o mayor en mol:mol de BVMO, más preferentemente, a 5000:1 o mayor en mol:mol, lo más preferentemente a 10000:1 o mayor en mol:mol de BVMO. El nivel máximo dependerá de la reacción particular, pero debe ser inferior a aquél al que disminuye la selectividad y/o conversión. En cualquier caso, generalmente es < 1000000:1 en mol:mol de BVMO, lo más preferentemente entre 25000 y 125000 veces la concentración molar de co-disolvente/sustrato con respecto a BVMO.

Ventajosamente, los inventores han encontrado que el uso de metanol, en particular como co-disolvente, aumenta enormemente el nivel relativo de producto de propionato de metilo en comparación con el producto de acetato de etilo, y también aumenta enormemente el nivel absoluto de propionato de metilo, además de los aumentos observados para cualquier otro co-disolvente.

Por consiguiente, lo más preferentemente, el co-disolvente usado es metanol.

Sorprendentemente, el uso de metanol a elevadas concentraciones en la mezcla de reacción aumenta la selectividad de la reacción de la BVMO para producir más inserciones anormales y más propionato de metilo con respecto al producto normal de acetato de etilo.

Preferentemente, por tanto, la relación de la producción de propionato de metilo: acetato de etilo por la enzima BVMO en el proceso anterior es al menos 1:5, más preferentemente al menos 1:2, todavía más preferentemente al menos 1:1,5, lo más preferentemente al menos 1:0,5.

Sorprendentemente, el uso de metanol a elevadas concentraciones también aumenta el nivel absoluto de producto de propionato de metilo producido en el proceso anterior.

Preferentemente, por tanto, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger convierte 2-butanona en propionato de metilo a un nivel absoluto de al menos 2 % de selectividad en el proceso anterior. Más preferentemente, la enzima monooxigenasa de Baeyer-Villiger convierte 2-butanona en propionato de metilo a un nivel absoluto de al menos 5 % de selectividad. Todavía más preferentemente, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger convierte 2-butanona en propionato de metilo a un nivel absoluto de al menos 9 % de selectividad.

Preferentemente, la monooxigenasa de Baeyer-Villiger convierte 2-butanona en propionato de metilo a un nivel relativo de al menos 20 %. Más preferentemente, la enzima monooxigenasa de Baeyer-Villiger convierte 2-butanona en propionato de metilo a un nivel relativo de al menos 50 %. Todavía más preferentemente, la enzima monooxigenasa de Baeyer-Villiger convierte 2-butanona en propionato de metilo a un nivel relativo de al menos 100 %.

Se trata preferentemente propionato de metilo para producir metacrilato de metilo o ácido metacrílico por cualquier proceso químico o bioquímico conocido adecuado. Preferentemente, el propionato de metilo se trata para producir

metacrilato de metilo o ácido metacrílico por reacción con formaldehído o una fuente adecuada del mismo en presencia de un catalizador adecuado como se ha descrito anteriormente.

5 Como se ha mencionado anteriormente, el proceso puede comprender además la etapa de formación de 2-butanona a partir de materias primas, en donde el término 'materias primas' incluye cualquier producto químico orgánico base capaz de ser transformado en 2-butanona, tal como, pero no se limita a: 2-butanol, acetoina, 2,3-butanodiol o metilvinilcetona.

Por tanto, según una realización de un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso de producción de metacrilato de metilo o ácido metacrílico que comprende las etapas de:

- (i) formación de 2-butanona a partir de materias primas;
- 10 (ii) conversión de dicha 2-butanona en propionato de metilo usando una monooxigenasa de Baeyer-Villiger según el primer aspecto; y
- (iii) tratamiento del propionato de metilo producido para obtener metacrilato de metilo o sus derivados.

Preferentemente, la etapa de formación de 2-butanona a partir de materias primas comprende la conversión de 2-butanol en 2-butanona.

15 Por tanto, según una realización preferida de un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso de producción de metacrilato de metilo o ácido metacrílico que comprende las etapas de:

- (i) formación de 2-butanona a partir de 2-butanol;
- (ii) conversión de dicha 2-butanona en propionato de metilo usando una monooxigenasa de Baeyer-Villiger según el primer aspecto; y
- 20 (iii) tratamiento del propionato de metilo producido para obtener metacrilato de metilo o sus derivados.

Esta conversión de 2-butanol en 2-butanona se puede catalizar tanto química como enzimáticamente. Preferentemente, se cataliza enzimáticamente esta conversión. Más preferentemente, esta conversión se cataliza por una enzima deshidrogenasa. Todavía más preferentemente, esta conversión se cataliza por una enzima alcohol deshidrogenasa en el número de grupo EC 1.1.1.X.

25 Preferentemente, la enzima alcohol deshidrogenasa es una enzima capaz de deshidrogenar butanol, tal como aquellas con el número EC 1.1.1.1. Más preferentemente, la alcohol deshidrogenasa es una enzima capaz de deshidrogenar butanol derivado de un organismo. Todavía más preferentemente, la deshidrogenasa capaz de deshidrogenar butanol puede derivar de, por ejemplo, uno de los siguientes organismos: *Acetobacter pasteurianus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeropyrum pernix*, especies de *Anastrepha*, *Avena sativa*, *Brassica napus*, especies de *Brevibacterium*, *Camellia sanensis*, especies de *Candida*, *Chlamydomonas moewussi*, *Citrillus lanatus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Coturnix coturnix*, *Cricetulus griseus*, *Crocus sativus*, *Cucumis melo*, *Desulfovibrio gigas*, *Devosia riboflavina*, *Dipodascus capitatus*, especies de *Drosophila*, *Emericulla nidulans*, *Entamoeba histolytica*, *Escherichia coli*, especies de *Euglena*, *Flavobacterium frigidimaris*, *Gallus gallus*, *Fragaria ananassa*, especies de *Geobacillus*, *Hafnia alvei*, *Hordeum vulgare*, especies de *Klebsiella*, especies de *Kluyveromyces*, especies de *Leifsonia*, especies de *Methylobacterium*, *Neurospora crassa*, *Oryza sativa*, especies de *Pseudomonas*, especies de *Rhodococcus*, especies de *Saccharomyces*, especies de *Sulfolobus*, especies de *Thermoanaerobacter*, *Thermomicrobium roseum*, *Thermoplasma acidophilum*, especies de *Thermus*, especies de *Triticum*, *Vicia fabia*, *Vitis vinifera*, *Zea mays*, *Zygosaccharomyces rouxii* o *Zymomonas mobilis*.

30 En una realización particularmente preferida, la enzima alcohol deshidrogenasa es una alcohol deshidrogenasa termostable dependiente de NADP con el número de grupo EC 1.1.1.2. Más preferentemente, la enzima alcohol deshidrogenasa es una alcohol deshidrogenasa termostable dependiente de NADP de un microbio termófilo. Todavía más preferentemente, la enzima alcohol deshidrogenasa es una alcohol deshidrogenasa termostable dependiente de NADP de una bacteria termófila. Lo más preferentemente, la enzima alcohol deshidrogenasa es una alcohol deshidrogenasa termostable dependiente de NADP de la bacteria *Thermoanaerobacter brockii* (Swiss-Prot: P14941.1).

45 Preferentemente, la enzima alcohol deshidrogenasa se co-expresa con la enzima BVMO en un organismo hospedador, que preferentemente es una bacteria. Preferentemente, por tanto, el vector de expresión tratado anteriormente comprende además secuencias genéticas que codifican la enzima alcohol deshidrogenasa y cualquier secuencia genética adicional necesaria para efectuar su expresión en una bacteria hospedadora, tales como, pero no se limitan a: promotores, terminadores, efectores en la dirección 3' o en la dirección 5', supresores, activadores, potenciadores, cofactores de unión, etc.

Alternativamente, la enzima alcohol deshidrogenasa se puede expresar en un organismo hospedador en un vector diferente de la enzima BVMO.

Ventajosamente, se ha encontrado que la alcohol deshidrogenasa también es realizable para proporcionar un sistema regenerador de NADPH. Durante su conversión de 2-butanol en 2-butanona, la alcohol deshidrogenasa oxidará 2-butanol proporcionando así electrones que están fácilmente disponibles para regenerar NADPH a partir de NADP⁺ producido por la BVMO durante su conversión de 2-butanona en propionato de metilo. Cuando se coexpresan tanto las enzimas alcohol deshidrogenasa como BVMO, puede ocurrir la regeneración de NADPH de círculo cerrado sin la necesidad de entrada externa de un agente de regeneración de NADPH al sistema. Mejorándose así la estequiometría y resolviendo un posible obstáculo de la reducción-oxidación creado por la catálisis de BVMO, esto permite que las reacciones de 2-butanol en 2-butanona en propionato de metilo avancen más rápido y más eficientemente que una reacción en cascada verdadera.

Preferentemente, esta etapa se lleva a cabo en una mezcla de reacción que comprende al menos la enzima alcohol deshidrogenasa, y el sustrato 2-butanol, de un modo que se conoce en la técnica y en condiciones que son óptimas para la enzima dada. Incluyendo dichas condiciones concentraciones y relaciones óptimas que son deducibles mediante procesos rutinarios dentro del conocimiento del experto.

Alternativamente, la etapa de formación de 2-butanona a partir de materias primas puede comprender la conversión de acetoína en 2,3-butanodiol, y la conversión de 2,3-butanodiol en 2-butanona.

Por tanto, según una realización adicional preferida de un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso de producción de metacrilato de metilo o ácido metacrílico que comprende las etapas de:

- (i) formación de 2,3-butanodiol a partir de acetoína;
- (ii) formación de 2-butanona a partir de 2,3-butanodiol;
- (iii) conversión de dicha 2-butanona en propionato de metilo usando una monooxigenasa de Baeyer-Villiger según el primer aspecto; y
- (iv) tratamiento del propionato de metilo producido para obtener metacrilato de metilo o ácido metacrílico.

Estas conversiones se pueden catalizar tanto química como enzimáticamente. Preferentemente, estas conversiones se catalizan enzimáticamente.

Más preferentemente, la conversión de acetoína en 2,3-butanodiol se cataliza por una enzima deshidrogenasa y la conversión de 2,3-butanodiol en 2-butanona se cataliza por una enzima deshidratasa. Todavía más preferentemente, la conversión de acetoína en 2,3-butanodiol se cataliza por una enzima alcohol deshidrogenasa con el número de grupo EC 1.1.1.X, y la conversión de 2,3-butanodiol en 2-butanona se cataliza por una enzima diol deshidratasa con el número de grupo EC 4.2.1.X.

Preferentemente, la enzima alcohol deshidrogenasa es una enzima capaz de deshidrogenar acetoína, tales como aquellas con el número de grupo EC 1.1.1.4 o 1.1.1.76. Más preferentemente, la enzima alcohol deshidrogenasa es una enzima capaz de deshidrogenar acetoína que deriva de un organismo. Todavía más preferentemente, la alcohol deshidrogenasa capaz de deshidrogenar acetoína deshidrogenasa puede derivar de, por ejemplo, uno de los siguientes organismos: *Aeromonas hydrophila*, especies de *Bacillus*, especies de *Brevibacillus*, especies de *Enterobacter*, especies de *Enterococcus*, *Gluconobacter oxydans*, especies de *Klebsiella*, *Lactococcus lactis*, especies de *Micrococcus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Paracoccus denitrificans*, especies de *Pseudomonas*, *Pyrococcus furiosus*, especies de *Saccharomyces*, *Corynebacterium glutamicum* o *Serratia marcescens*.

Preferentemente, la enzima diol deshidratasa es una enzima diol deshidratasa capaz de deshidratar 2,3-butanodiol, tal como aquellas con el número de grupo EC 4.2.1.28. Más preferentemente, la diol deshidratasa capaz de deshidratar 2,3-butanodiol es una diol deshidratasa que deriva de un organismo. Todavía más preferentemente, la diol deshidratasa capaz de deshidratar 2,3-butanodiol puede derivar, por ejemplo, de uno de los siguientes organismos: especies de *Acetobacterium*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium glycolicum*, especies de *Flavobacterium*, especies de *Klebsiella*, especies de *Lactobacillus*, especies de *Salmonella* o *Propionibacterium freudenreichii*.

Preferentemente, la enzima alcohol deshidrogenasa y la enzima diol deshidratasa se co-expresan con la enzima BVMO en un organismo hospedador, que preferentemente es una bacteria. Preferentemente, por tanto, el vector de expresión tratado anteriormente comprende además secuencias genéticas que codifican la enzima alcohol deshidrogenasa y la enzima diol deshidratasa y cualquier secuencia genética adicional necesaria para efectuar su expresión en una bacteria hospedadora, tales como, pero no se limitan a: promotores, terminadores, efectores en la dirección 3' o en la dirección 5', supresores, activadores, potenciadores, cofactores de unión, etc.

Alternativamente, la enzima alcohol deshidrogenasa y/o la enzima diol deshidratasa se pueden expresar en un organismo hospedador en un vector diferente de la enzima BVMO.

Preferentemente, esta etapa se lleva a cabo en una mezcla de reacción que comprende al menos la enzima alcohol deshidrogenasa, la enzima diol deshidratasa y el sustrato acetoína de un modo que se conoce en la técnica y en

condiciones que son óptimas para las enzimas dadas. Siendo dichas condiciones que incluyen concentraciones y relaciones óptimas deducibles mediante procesos rutinarios dentro del conocimiento del experto.

Alternativamente, la etapa de formación de 2-butanona a partir de materias primas puede comprender la conversión de acetoína en metilvinilcetona, y la conversión de metilvinilcetona en 2-butanona.

5 Por tanto, según una realización adicional preferida de un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso de producción de metacrilato de metilo o ácido metacrílico que comprende las etapas de:

(i) formación de metilvinilcetona a partir de acetoína;

(ii) formación de 2-butanona a partir de metilvinilcetona;

10 (iii) conversión de dicha 2-butanona en propionato de metilo usando una monooxigenasa de Baeyer-Villiger según el primer aspecto; y

(iv) tratamiento del propionato de metilo producido para obtener metacrilato de metilo o ácido metacrílico.

Estas conversiones se pueden catalizar tanto química como enzimáticamente. Preferentemente, estas conversiones se catalizan enzimáticamente.

15 Más preferentemente, la conversión de acetoína en metilvinilcetona se cataliza por una enzima alcohol deshidratasa y la conversión de metilvinilcetona en 2-butanona se cataliza por una enona reductasa. Todavía más preferentemente, la conversión de acetoína en metilvinilcetona se cataliza por una enzima alcohol deshidratasa con el número de grupo EC 4.2.1.X, y la conversión de metilvinilcetona en 2-butanona se cataliza por una enona reductasa con el número de grupo EC 1.1.1.X o 1.3.1.X.

20 Preferentemente, la enzima alcohol deshidratasa es una enzima capaz de deshidratar acetoína, tales como las enzimas con el número de grupo EC 4.2.1.53 o 4.2.1.43 o 4.2.1.3 o las descritas por Jianfeng et al. en Chemical Communications, 2010, 46, 8588-8590. Más preferentemente, la enzima alcohol deshidratasa es una enzima capaz de deshidratar acetoína que deriva de un organismo. Todavía más preferentemente, la alcohol deshidratasa capaz de deshidratar acetoína puede derivar de, por ejemplo, uno de los siguientes organismos: especies de *Pseudomonas*, *Elizabethkingia meningoseptica*, *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Pelomonas saccharophila*, especies de *Rhizobium*, especies de *Sulfolobus*, *Acer pseudoplatanus*, *Arabidopsis thaliana*, *Aspergillus niger*, *Azotobacter vinelandii*, especies de *Bacillus*, *Bacteroides fragilis*, *Bos taurus*, *Caenorhabditis elegans*, *Corynebacterium glutamicum*, especies de *Drosophila*, *Escherichia coli*, *Crassostrea virginica*, especies de *Cucurbita*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mus musculus*, especies de *Nicotiana*, *Plasmodium falciparum*, especies de *Rattus*, especies de *Saccharomyces*, especies de *Salmonella*, especies de *Streptomyces*, *Zea mays* o *Xanthomonas campestris*.

35 Preferentemente, la enzima enona reductasa es una enzima capaz de reducir metilvinilcetona tales como las enzimas con el número de grupo EC 1.1.1.54 o 1.3.1.31 o las descritas por Yamamoto et al. en la patente de EE.UU. 6780967. Más preferentemente, la enzima enona reductasa es una enzima capaz de reducir metilvinilcetona que deriva de un organismo. Todavía más preferentemente, la enona reductasa capaz de reducir metilvinilcetona puede derivar de, por ejemplo, uno de los siguientes organismos: *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium kluyveri*, *Saccharomyces pombe*, *Nicotiana tabacum*, *Euglena gracilis*, *Astasia longa*, *Kluyveromyces lactis*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* o especie de *Rattus*.

40 Preferentemente, la enzima enona reductasa y la enzima alcohol deshidratasa se co-expresan con la enzima BVMO en un organismo hospedador, que preferentemente es una bacteria. Preferentemente, por tanto, el vector de expresión tratado anteriormente comprende además secuencias genéticas que codifican la enzima alcohol deshidrogenasa y cualquier secuencia genética adicional necesaria para efectuar su expresión en una bacteria hospedadora, tales como, pero no se limitan a: promotores, terminadores, efectores en la dirección 3' o en la dirección 5', supresores, activadores, potenciadores, cofactores de unión, etc.

45 Alternativamente, la enzima enona reductasa y/o la alcohol deshidratasa se pueden expresar en un organismo hospedador en un vector diferente de la enzima BVMO.

Preferentemente, esta etapa se lleva a cabo en una mezcla de reacción que comprende al menos la enzima enona reductasa, alcohol deshidratasa y el sustrato acetoína de un modo que se conoce en la técnica y en condiciones que son óptimas para las enzimas dadas. Siendo dichas condiciones que incluyen concentraciones y relaciones óptimas deducibles mediante procesos rutinarios dentro del conocimiento del experto.

50 Como se ha mencionado anteriormente, el proceso puede comprender además la etapa de fermentación de azúcares y/o glicerol y/o gases convertibles por microbios (tales como gases ricos en CO y/o CO₂) para producir materias primas, en donde el término 'materias primas' incluyen cualquier producto químico orgánico de base capaz de ser transformado en 2-butanona, tales como, pero no se limitan a: 2-butanol, acetoína, 2,3-butanodiol o metilvinilcetona.

Por tanto, según una realización adicional de un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso de producción de metacrilato de metilo o ácido metacrílico que comprende las etapas de:

(i) fermentación de dicho azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios para producir materias primas;

5 (ii) formación de 2-butanona a partir de dichas materias primas;

(iii) conversión de dicha 2-butanona en propionato de metilo usando una monooxigenasa de Baeyer-Villiger según el primer aspecto; y

(iv) tratamiento del propionato de metilo producido para obtener metacrilato de metilo o ácido metacrílico.

10 Preferentemente, la etapa de fermentación de azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios para producir materias primas comprende la fermentación de azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios para producir 2-butanol.

Por tanto, según una realización adicional preferida de un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso de producción de metacrilato de metilo o ácido metacrílico que comprende las etapas de:

(i) fermentación de azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios para producir 2-butanol;

15 (ii) formación de 2-butanona a partir de 2-butanol;

(iii) conversión de dicha 2-butanona en propionato de metilo usando una monooxigenasa de Baeyer-Villiger según el primer aspecto; y

(iv) tratamiento del propionato de metilo producido para obtener metacrilato de metilo o ácido metacrílico.

20 Preferentemente, se cataliza enzimáticamente la fermentación de azúcares en 2-butanol. Se conocen bien en la técnica los procesos para realizar dicha fermentación, por ejemplo, dicho proceso se describe en la patente de EE.UU. número US5753474, o más recientemente en la solicitud PCT número WO2007/130521.

25 En particular, el documento de patente WO2007/130521 desvela cuatro vías diferentes de la fermentación de biomasa, específicamente biomasa que es una fuente de azúcares fermentables (véase la lista dada en las páginas 59 y 60), que se puede usar para producir 2-butanol a escala industrial (véase la Figura 1 del documento de patente WO2007/130521).

30 Adecuadamente, el organismo fermentador es un organismo que utiliza hidrato de carbono, por tanto los azúcares disponibles en la biomasa se recogen por vías naturales y entran en la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la vía de Entner-Doudoroff y la vía de la pentosa fosfato que son las principales vías metabólicas que proporcionan energía de hidratos de carbono para el crecimiento. Es clave para estas vías el producto intermedio gliceraldehído-3-fosfato que se convierte en piruvato durante la respiración para producir energía. Por tanto, el piruvato es una sustancia química fácilmente disponible que existe de forma natural creada en la mayoría de los organismos que utilizan hidratos de carbono.

35 Como se describe en el documento de patente WO2007/130521, el piruvato se pueden convertir en 2-butanol usando un organismo que utiliza hidrato de carbono modificado que se ha manipulado genéticamente para contener la bioquímica apropiada para realizar cualquiera de las cuatro vías anteriores en la Figura 1. Por ejemplo, se puede usar la vía 1, la vía 1 contiene las etapas de conversión a, b, c, d, e y f.

40 La etapa (a) comprende la conversión de dos moléculas de piruvato en alfa-acetolactato. Preferentemente, se usan las enzimas con el número de grupo EC EC 2.2.1.6 para catalizar esta reacción, tales como, por ejemplo: una acetolactato sintasa o una acetohidroxi ácido sintasa. Más preferentemente, la enzima usada para catalizar esta reacción es una acetolactato sintasa. Todavía más preferentemente, es una de las siguientes acetolactato sintasas: *Bacillus subtilis* (GenBank: AAA22222 NCBI L04470), *Klebsiella terrigena* (GenBank: AAA25055 NCBI L04507) o *Klebsiella pneumoniae* (GenBank: AAA25079 NCBI M73842).

45 La etapa (b) comprende la conversión de alfa-acetolactona en acetoína. Preferentemente, se usan las enzimas con el número de grupo EC EC 4.1.1.5 para catalizar esta reacción, tales como, por ejemplo: una acetolactato descarboxilasa. Más preferentemente, es una de las siguientes acetolactato descarboxilasas: *Bacillus subtilis* (GenBank: AAA22223 NCBI L04470), *Klebsiella terrigena* (GenBank: AAA25054 NCBI L04507) o *Klebsiella pneumoniae* (GenBank: AAU43774 NCBI AY22056).

50 La etapa (c) comprende la conversión de acetoína en 3-amino-2-butanol. Preferentemente, se usan las enzimas en el grupo general de las transaminasas o aminosas reductoras para catalizar esta reacción, por ejemplo: una transaminasa dependiente de piridoxal fosfato que se puede considerar una acetoína aminosasa. Más preferentemente, la transaminasa dependiente de piridoxal fosfato es una amino:piruvato transaminasa. Todavía

más preferentemente, es una amino:piruvato transaminasa de *Vibrio fluvialis* JS17 (véase el Ejemplo 13 del documento de patente WO2007/130521).

5 La etapa (d) comprende la conversión de 3-amino-2-butanol en O-fosfato de 3-amino-2-butanol. Preferentemente, se usan las enzimas en el grupo general de las aminoalcohol cinasas para catalizar esta reacción, por ejemplo: una etanolamina cinasa dependiente de ATP con el número EC 2.7.1.82 que se puede considerar una aminobutanol cinasa. Más preferentemente, la etanolamina cinasa dependiente de ATP se origina de una especie de los géneros *Pseudomonas* o *Erwinia*. Todavía más preferentemente, es una etanolamina cinasa dependiente de ATP de la cepa SCRI1043 de *Erwinia carotovera* (véase el Ejemplo 14 del documento de patente WO2007/130521).

10 La etapa (e) comprende la conversión de O-fosfato de 3-amino-2-butanol en 2-butanona. Preferentemente, se usan las enzimas en el grupo general de las aminoalcohol fosfato fosfo-liasas para catalizar esta reacción, tales como, por ejemplo: una fosfoetanolamina fosfo-liasa dependiente de piroxidal fosfato que se puede considerar una aminobutanol fosfato fosfo-liasa. Más preferentemente, la fosfoetanolamina fosfo-liasa dependiente de piroxidal fosfato se origina de una especie de los géneros *Pseudomonas* o *Erwinia*. Todavía más preferentemente, es una fosfoetanolamina fosfo-liasa dependiente de piroxidal fosfato de la cepa SCRI1043 de *Erwinia carotovera* (véase el Ejemplo 15 del documento de patente WO2007/130521).

15 La etapa (f) comprende la conversión de 2-butanona en 2-butanol. Preferentemente, se usan las enzimas con el número de grupo EC EC 1.1.1.2 para catalizar esta reacción, tales como, por ejemplo, una butanol deshidrogenasa, o una ciclohexanona deshidrogenasa. Más preferentemente, la enzima usada para catalizar esta reacción es una butanol deshidrogenasa. Todavía más preferentemente, la enzima usada para catalizar esta reacción es una de las siguientes butanol deshidrogenasas: *Pyrococcus furiosus* (GenBank: AAC25556 NCBI AF013169) o *Escherichia coli* (GenBank: NP_417484 NCBI NC_000913).

20 El documento de patente WO2007/130521 describe además las técnicas y procedimientos conocidos en la técnica que se pueden usar para construir vectores plasmídicos que codifican las diversas enzimas de forma que se pueda expresar una vía en un organismo hospedador, como demostración, se ejemplifica completamente la vía 3.

25 Además, la solicitud de patente relacionada WO2007/146377 describe diversos organismos tolerantes al butanol que se pueden usar en dicho proceso para la producción industrial de 2-butanol, específicamente organismos del género *Lactobacillus*. Las especies tolerantes al butanol particularmente ventajosas se identificaron como *Lactobacillus plantarum* PN0510, *Lactobacillus plantarum* (PN0511), *Lactobacillus plantarum* (PN0512) y *Lactobacillus arizonensis* PN0514. En una realización particularmente preferida de la presente invención, al menos una de estas especies tolerantes al butanol específicas se usa como el organismo hospedador para expresar una cualquiera de las vías anteriores descritas por el documento de patente WO2007/130521.

30 Preferentemente, se cataliza enzimáticamente la fermentación de glicerol en 2-butanol. Se conocen bien en la técnica los procesos para realizar dicha fermentación, por ejemplo, dicho proceso se describe en la patente de EE.UU. número US8119844B2, y más recientemente en la solicitud de patente de EE.UU. número US2011/207191.

35 En particular, el documento de patente US8119844 desvela la fermentación anaerobia de glicerol comercial o un subproducto que contiene glicerol de residuos industriales para producir butanol usando el organismo *Clostridium pasteurianum*.

40 El documento de patente US8119844 describe que la fermentación anaerobia se realiza en un bioreactor como se conoce en la técnica de, por ejemplo, Biebel (Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology (2001) 27, pp.18-26) con la bacteria natural *Clostridium pasteurianum* que es capaz de convertir sustratos de glicerol en 2-butanol mediante vías naturales.

Por consiguiente, preferentemente, la bacteria usada en la etapa de conversión de glicerol en 2-butanol es una bacteria natural, más preferentemente una bacteria natural del género *Clostridium*, todavía más preferentemente una bacteria natural de la especie *Clostridium pasteurianum* DSMZ 525.

45 Opcionalmente, la bacteria usada en la etapa de conversión de glicerol en 2-butanol se puede modificar de forma que su capacidad para realizar dicha conversión se potencie o altere en un modo ventajoso por técnicas relevantes conocidas en la técnica.

50 Preferentemente, el sustrato de glicerol deriva de subproductos de residuos industriales de forma que se minimiza el impacto ecológico general o el uso de combustibles fósiles del proceso de la presente invención. Las fuentes adecuadas de dicho glicerol residual incluyen, pero no se limitan a: producción de biodiésel, saponificación de grasas, producción de bebidas alcohólicas, producción de aceite de palma o procesos oleoquímicos. Preferentemente, el sustrato de glicerol deriva de la producción de biodiésel.

55 Adecuadamente, la bacteria usada para convertir glicerol en 2-butanol se fermenta con un suministro de sustrato de glicerol y se aísla el producto de 2-butanol de los medios de fermentación. Se puede usar cualquier técnica de fermentación apropiada como se trata en el documento de patente US8119844. Sin embargo, los medios de fermentación se preparan preferentemente como se describe en el ejemplo del documento de patente US8119844, y

la técnica de fermentación se extrapola preferentemente a situaciones industriales del ejemplo dado en el documento de patente US8119844, y preferentemente el aislamiento del producto de butanol se lleva a cabo como se describe en las columnas 10 y 11 del documento de patente US8119844.

5 Opcionalmente, puede estar presente acetato para potenciar la producción de 2-butanol a partir de glicerol, y opcionalmente se puede retirar metanol del sustrato de glicerol para potenciar la producción de 2-butanol a partir de glicerol. Preferentemente, está presente acetato en los medios de fermentación a una concentración de al menos 1 g/L. Preferentemente, la concentración de metanol en el sustrato de glicerol es como máximo 10 g/L. Los métodos de retirada de metanol del sustrato de glicerol se describen en la columna 8 y el ejemplo de 'Glycerol Preparation from Biodiesel Waste' en el documento de patente US8119844.

10 Preferentemente, la fermentación se realiza por uno o más organismos. Más preferentemente, la fermentación se realiza por organismos capaces de producir la enzima o enzimas necesarias para convertir azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios en 2-butanol. Preferentemente, la fermentación se realiza por organismos naturales que expresan naturalmente la enzima o enzimas relevantes necesarias para convertir azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios en 2-butanol. Más preferentemente, por tanto, la fermentación se realiza por organismos naturales que comprenden las secuencias genéticas endógenas que codifican la enzima o enzimas necesarias para convertir azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios en 2-butanol. Los ejemplos de dichos organismos que se usan preferentemente en la presente invención se detallan en las referencias anteriormente mencionadas que describen dichos procedimientos de fermentación.

20 Alternativamente, la fermentación se puede realizar por organismos genéticamente modificados que se han modificado para expresar la enzima o enzimas necesarias para convertir azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios en 2-butanol. Preferentemente, por tanto, cada uno de los organismos recombinantes comprende un vector de expresión que a su vez comprende secuencias genéticas exógenas que codifican la enzima o enzimas necesarias para convertir azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios en 2-butanol, más cualquier secuencia genética adicional necesaria para efectuar su expresión en el organismo hospedador, tal como, pero no se limitan a: promotores, terminadores, efectores en la dirección 3' o en la dirección 5', supresores, activadores, potenciadores, cofactores de unión, etc.

25 Preferentemente, el uno o más organismos hospedadores usados para la fermentación de azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios en 2-butanol son bacterias u hongos. Preferentemente, por tanto, las bacterias u hongos hospedadores comprenden además secuencias genéticas que codifican la capacidad para exportar el 2-butanol producido fuera de la célula bacteriana en los medios circundantes. Estas secuencias genéticas pueden ser endógenas o exógenas. La capacidad para exportar 2-butanol en los medios circundantes se puede conferir por secuencias genéticas que codifican una vía de transporte transmembrana, una vía de direccionamiento a la membrana celular, una vía excretora a la membrana celular, o se puede conferir por un simple gradiente de difusión a través de la membrana celular.

30 Por ejemplo, en el caso de bacterias, las vías transmembrana pueden ser una cualquiera de las siguientes: un transportador de tipo I, II, III, IV, V, VI presente en la membrana de una bacteria Gram-negativa; la vía Sec o TaT presente en la membrana de bacterias Gram-positivas; la vía de exocitosis de una vesícula en bacterias Gram-negativas; o la vía de la marca del extremo N en bacterias Gram-positivas.

35 Sin embargo, preferentemente, el producto de 2-butanol se exporta fuera de las células bacterianas o fúngicas por simple difusión.

En una realización preferida, los organismos usados para la etapa de fermentación son *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus arizonensis* y/o *Clostridium pasteurianum*.

40 Alternativamente, la etapa de fermentación de azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios para producir materias primas puede comprender la fermentación de azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios para producir acetoína.

Por tanto, según una realización adicional preferida de un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso de producción de metacrilato de metilo o ácido metacrílico que comprende las etapas de:

- (i) fermentación de azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios para producir acetoína;
- (ii) formación de 2,3-butanodiol a partir de acetoína;
- 50 (iii) formación de 2-butanona a partir de 2,3-butanodiol;
- (iv) conversión de dicha 2-butanona en propionato de metilo usando una monooxigenasa de Baeyer-Villiger según el primer aspecto; y
- (v) tratamiento del propionato de metilo producido para obtener metacrilato de metilo o ácido metacrílico.

Alternativamente, según una realización adicional de un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso de producción de metacrilato de metilo o ácido metacrílico que comprende las etapas de:

- (i) fermentación de azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios para producir acetoína;
- (ii) formación de metilvinilcetona a partir de acetoína;
- 5 (iii) formación de 2-butanona a partir de metilvinilcetona;
- (iv) conversión de dicha 2-butanona en propionato de metilo usando una monooxigenasa de Baeyer-Villiger según el primer aspecto; y
- (v) tratamiento del propionato de metilo producido para obtener metacrilato de metilo o ácido metacrílico.

10 Preferentemente, se cataliza enzimáticamente la fermentación de azúcares en acetoína. Se conocen bien en la técnica los procesos para realizar dicha fermentación, por ejemplo, dichos procesos se describen por Hespell en Current Microbiology Vol. 32 (1996), pp291-296, y también se describe un proceso adicional en la patente europea número EP0430406B1.

15 En particular, el documento de patente EP0430406B1 desvela la conversión de fuentes de azúcar con altos rendimientos de acetoína usando un cultivo de fermentación con agitación en donde la conversión se realiza por una bacteria ácido láctica.

20 El documento de patente EP0430406B1 describe que las bacterias ácido lácticas pueden producir acetoína a altos niveles a partir de fuentes de ácido pirúvico tales como ácido cítrico o glucosa. Específicamente, esos altos niveles de acetoína se pueden producir a partir de la fermentación aerobia de una bacteria ácido láctica con una fuente de azúcar en una técnica de fermentación con agitación con la adición de una sal metálica y una fuente de porfirina de hierro.

25 Por consiguiente, preferentemente, la bacteria usada en la etapa de conversión de azúcares en acetoína es una bacteria natural, más preferentemente una bacteria ácido láctica natural, todavía más preferentemente una bacteria ácido láctica natural del género *Lactococcus*, *Leuconostoc*, o *Lactobacillus*, aún más preferentemente una bacteria ácido láctica natural de las especies *Streptococcus lactis* (ATCC 11007), *Lactococcus lactis* (FERM-BP-2805), *Lactobacillus casei* (FERM-BP-2806), *Lactobacillus casei* (ATCC334), o *Leuconostoc cremoris* (ATCC19254).

Opcionalmente, la bacteria usada en la etapa de conversión de azúcares en acetoína se puede modificar de forma que su capacidad para realizar dicha conversión se potencie o altere en un modo ventajoso por técnicas relevantes conocidas en la técnica.

30 Preferentemente, el sustrato de azúcar deriva de cualquier fuente de carbono que sea capaz de ser utilizada por la bacteria fermentadora. Más preferentemente, el sustrato de azúcar es glucosa o lactosa.

35 Adecuadamente, se fermenta la bacteria usada para convertir azúcares en acetoína con un suministro de sustrato de azúcar y se aísla el producto de acetoína de los medios de fermentación. Se puede usar cualquier técnica de fermentación apropiada. Sin embargo, preferentemente, el medio de fermentación es medio MRS, más preferentemente el medio MRS se prepara como se describe en la página 4 línea 5 del documento de patente EP0430406B1, que se puede extrapolar a situaciones industriales. Preferentemente, la técnica de fermentación usada es como se describe en cualquiera de los ejemplos del documento de patente EP0430406B1, que también se puede extrapolar a situaciones industriales, más preferentemente la técnica de fermentación usada es la descrita en el Ejemplo 3 de 0430406B1.

40 Preferentemente, se cataliza enzimáticamente la fermentación de glicerol en acetoína. Se conocen bien en la técnica los procesos para realizar dicha fermentación, por ejemplo, dicho proceso se describe en la solicitud anteriormente mencionada PCT WO2007/130521, y la publicación mucho más anterior de Dobrogosz et al. Journal of Bacteriology, vol. 84 (1962) pp. 716-723.

45 En particular, Dobrogosz *et al.* demuestran que el conocimiento de ciertos organismos que producen acetoína directamente a partir de glicerol ha existido desde 1962. La Tabla 3 muestra la significativa acumulación de acetoína en la bacteria *Pediococcus pentosaceus*.

Dobrogosz describe que en condiciones de fermentación aerobias, las bacterias de la familia *Lactobacillaceae* (o bacterias ácido lácticas) pueden producir acetoína a partir del sustrato de glicerol mediante una vía inherente que avanza mediante el producto intermedio clave ácido pirúvico (véase la Figura 4).

50 Por consiguiente, preferentemente, la bacteria usada en la etapa de conversión de glicerol en acetoína es una bacteria natural, más preferentemente una bacteria ácido láctica natural, todavía más preferentemente una bacteria ácido láctica natural del género *Pediococcus* o *Streptococcus*, aún más preferentemente una bacteria ácido láctica natural de las especies *Pediococcus pentosaceus* Az-25-5/*Pediococcus cerevisiae*, o *Streptococcus faecalis* B33A/10C1.

Opcionalmente, la bacteria usada en la etapa de conversión de glicerol en acetoína se puede modificar de forma que su capacidad para realizar dicha conversión se potencie o altere en un modo ventajoso por técnicas relevantes conocidas en la técnica.

5 Preferentemente, el sustrato de glicerol deriva de subproductos de residuo industrial de forma que se minimiza el impacto ecológico general o el uso de combustibles fósiles del proceso de la presente invención. Las fuentes adecuadas de dicho glicerol residual incluyen, pero no se limitan a: producción de biodiésel, saponificación de grasas, producción de bebidas alcohólicas, producción de aceite de palma o procesos oleoquímicos. Preferentemente, el sustrato de glicerol deriva de la producción de biodiésel.

10 Adecuadamente, se fermenta la bacteria usada para convertir glicerol en acetoína con un suministro de sustrato de glicerol y se aísla el producto de acetoína de los medios de fermentación. Se puede usar cualquier técnica de fermentación apropiada. Sin embargo, preferentemente, el medio de fermentación es medio basal NYE con la adición de sustrato de glicerol, más preferentemente el medio de fermentación es medio basal NYE como se describe en la página 717 de Dobrogosz con la adición de al menos glicerol 0,163 M como se describe en la Tabla 3 de Dobrogosz. Preferentemente, el método de fermentación usado es como se describe en la página 717 de Dobrogosz que se puede extrapolar a condiciones industriales, en donde solo está presente glicerol en el medio NYE y no se añade glucosa, adecuadamente se mantiene aerobiosis para permitir el crecimiento sobre el sustrato de glicerol. Preferentemente, la fermentación se realiza en una disposición de tipo discontinua en donde cada fermentación discontinua se lleva a cabo durante un periodo de entre 24 y 48 horas.

20 Preferentemente, la fermentación se realiza por uno o más organismos. Más preferentemente, la fermentación se realiza por organismos capaces de producir la enzima o enzimas necesarias para convertir azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios en acetoína. Preferentemente, la fermentación se realiza por organismos naturales que expresan naturalmente la enzima o enzimas relevantes necesarias para convertir azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios en acetoína. Más preferentemente, por tanto, la fermentación se realiza por organismos naturales que comprenden las secuencias genéticas endógenas que codifican la enzima o enzimas necesarias para convertir azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios en acetoína. Los ejemplos de dichos organismos que se usan preferentemente en la presente invención se detallan en las referencias anteriormente mencionadas que describen dichos procedimientos de fermentación.

25 Alternativamente, la fermentación se puede realizar por organismos genéticamente modificados que se han modificado para expresar la enzima o enzimas necesarias para convertir azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios en acetoína. Preferentemente, por tanto, cada uno de los organismos recombinantes comprende un vector de expresión que a su vez comprende secuencias genéticas exógenas que codifican la enzima o enzimas necesarias para convertir azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios en acetoína, más cualquier secuencia genética adicional necesaria para efectuar su expresión en el organismo hospedador, tales como, pero no se limitan a: promotores, terminadores, efectores en la dirección 3' o en la dirección 5', supresores, activadores, potenciadores, cofactores de unión, etc.

30 Preferentemente, el uno o más organismos hospedadores usados para la fermentación de azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios en acetoína son bacterias u hongos. Preferentemente, por tanto, las bacterias u hongos hospedadores comprenden además secuencias genéticas que codifican la capacidad para exportar la acetoína producida fuera de la célula bacteriana en los medios circundantes. Estas secuencias genéticas pueden ser endógenas o exógenas. La capacidad para exportar acetoína en los medios circundantes se puede conferir por secuencias genéticas que codifican una vía de transporte transmembrana, una vía excretora a la membrana celular, una vía de direccionamiento a la membrana celular, o se puede conferir simplemente por un gradiente de difusión a través de la membrana celular.

35 Por ejemplo, en el caso de bacterias, las vías transmembrana pueden ser una cualquiera de las siguientes: un transportador de tipo I, II, III, IV, V, VI presente en la membrana de una bacteria Gram-negativa; la vía Sec o TaT presente en la membrana de bacterias Gram-positivas; la vía de exocitosis de una vesícula en bacterias Gram-negativas; o la vía de la marca del extremo N en bacterias Gram-positivas.

Sin embargo, preferentemente, el producto de acetoína se exporta fuera de las células bacterianas o fúngicas por simple difusión.

50 En una realización preferida, los organismos usados para la etapa de fermentación son *Lactococcus lactis* y/o *Pediococcus pentosaceus*.

55 Preferentemente, los azúcares usados en la fermentación son monosacáridos o disacáridos que existen de forma natural. Dichos azúcares incluyen, pero no se limitan a: glucosa, fucosa, arabinosa, ribosa, rubulosa, alosa, altrosa, galactosa, xilosa, fructosa, gulosa, lixosa, manosa, ramnosa, treosa, talosa, iodosa, sacarosa, lactosa, lactulosa, maltosa, trehalosa, celubiosa, kojibiosa, nigerosa, isomaltosa, soforosa, laminaribiosa, gentiobiosa, turanosa, maltulosa, palatinosa, gentiobiulosa, manobiosa, melibiosa, rutinosa, rutinulosa o xilobiosa. Más preferentemente, los azúcares son glucosa o maltosa. Todavía más preferentemente, los azúcares son glucosa, particularmente D-glucosa.

Alternativamente, los azúcares usados en la fermentación se pueden proporcionar como polisacáridos que existen de forma natural, que entonces son capaces de ser hidrolizados por los organismos fermentadores u otras enzimas adicionales para producir los monosacáridos y disacáridos anteriores. Los polisacáridos adecuados incluyen, pero no se limitan a: celulosa, amilosa, amilopectina, glucógeno, arabinoxilano, quitina, pectina, etc.

- 5 Preferentemente, la fermentación por el organismo se realiza anaeróbicamente o microaeróbicamente.

Las técnicas de fermentación anaerobia adecuadas incluyen las generalmente conocidas en la técnica, tales como, pero no se limitan a: fermentación sumergida, de superficie, semisólida o en estado sólido. Preferentemente, la técnica de fermentación usada es fermentación sumergida debido a su facilidad de automatización y, por tanto, su mayor eficiencia.

- 10 Preferentemente, la fermentación por el organismo se realiza en un caldo de fermentación adecuado como se conoce en la técnica. Preferentemente, el caldo de fermentación comprende: los azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios mezclados con agua, el organismo, medios ricos o medios mínimos, más componentes adicionales tales como, pero no se limitan a: una fuente de nitrógeno tal como disolución de amoniaco; sales minerales tales como calcio, magnesio, cinc y cobre; y oligoelementos tales como selenio, boro, hierro, manganeso, fósforo y azufre; un agente quelante tal como EDTA; ferrocianuro; carbón vegetal; resinas de intercambio catiónico; un agente antiespumante tal como alcohol estearílico, aceite de semilla de algodón, aceite de linaza, aceite de oliva, aceite de ricino, siliconas o sulfonatos; y metanol.

- 20 Preferentemente, los sustratos de azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios se alimentan al caldo de fermentación durante el transcurso de la fermentación para evitar la inhibición del sustrato de los procesos enzimáticos. Preferentemente, la concentración de los azúcares y/o glicerol dentro del caldo de fermentación se mantiene al menos a aproximadamente 25 g/L. Más preferentemente, la concentración de los azúcares y/o glicerol dentro del caldo de fermentación se mantiene a entre aproximadamente 25 y 125 g/L. Preferentemente, los azúcares y/o glicerol se mantienen entre estos niveles usando una alimentación constante de sustrato en el caldo de fermentación en donde la concentración de alimentación es al menos suficiente para mantener vivos la mayoría de los organismos hospedadores, pero no suficiente para inhibir la formación de producto.

El gas convertible por microbios se puede alimentar al sustrato de fermentación a un nivel de 0,1-15 mol/L.h, más preferentemente a un nivel de 0,2-5 mol/L.h, lo más preferentemente 0,3-1 mol/L.h.

Las fermentaciones y reacciones catalizadas por BVMO de la presente invención pueden ser continuas o discontinuas, preferentemente, se usa un proceso continuo.

- 30 El término 'aproximadamente', como se usa con referencia a la concentración de azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios, indica un límite marginal de un máximo de 20 % por encima o por debajo del valor establecido. Sin embargo, preferentemente, la concentración de azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios está dentro del 10 % por encima o por debajo del valor establecido.

- 35 Preferentemente, los productos 2-butanol o acetoína producidos a partir del caldo de fermentación se retiran *in situ* para evitar la inhibición de producto de los procesos enzimáticos. Preferentemente, por tanto, la concentración de 2-butanol y/o acetoína en el caldo de fermentación se mantiene por debajo del nivel al que es capaz de inhibir el proceso de fermentación, preferentemente esto es por debajo de aproximadamente 50 g/L, más preferentemente por debajo de aproximadamente 25 g/L, todavía más preferentemente por debajo de aproximadamente 10 g/L.

- 40 El término 'aproximadamente', como se usa con referencia a la concentración de 2-butanol y/o acetoína, indica un límite marginal de un máximo de 20 % por encima o por debajo del valor establecido. Sin embargo, preferentemente, la concentración de 2-butanol y/o acetoína está dentro del 10 % por encima o por debajo del valor establecido.

Preferentemente, se controla cuidadosamente la fuente de nitrógeno. Preferentemente, la fuente de nitrógeno es disolución de amonio y preferentemente está presente en el caldo a una concentración de aproximadamente 0-4 g/L.

- 45 El término 'aproximadamente', como se usa con referencia a la concentración de fuente de nitrógeno, indica un límite marginal de un máximo de 20 % por encima o por debajo del valor establecido. Sin embargo, preferentemente, la concentración de fuente de nitrógeno está dentro del 10 % por encima o por debajo del valor establecido.

Preferentemente, el caldo se mantiene en un recipiente de tamaño sustancial para fines industriales. El recipiente puede ser un tanque en el intervalo de 40 a 200 metros cúbicos o un fermentador mayor en el intervalo de 200 a 900 metros cúbicos de capacidad.

- 50 Preferentemente, el caldo de fermentación se mantiene aséptico para detener cualquier crecimiento de microorganismos extraños.

Preferentemente, la fermentación se lleva a cabo a una temperatura óptima para maximizar la cantidad de rendimiento de producto deseado de los organismos. Preferentemente, la fermentación se lleva a cabo a una

temperatura de entre aproximadamente 20 y 50 °C, preferentemente entre aproximadamente 20 y 35 °C, lo más preferentemente entre aproximadamente 28-32 °C.

5 El término 'aproximadamente', como se usa con referencia a la temperatura, indica un límite marginal de un máximo de 10 % por encima o por debajo del valor establecido. Sin embargo, preferentemente la temperatura está dentro del 5 % por encima o por debajo del valor establecido.

Preferentemente, la fermentación se lleva a cabo a un pH óptimo para el metabolismo bacteriano de 6,5 a pH 8,5. Más preferentemente, el tampón mantiene la mezcla de reacción a un pH de entre aproximadamente pH 7,3 y 7,7. Todavía más preferentemente, el tampón mantiene la mezcla de reacción a un pH de aproximadamente 7,5.

10 El término 'aproximadamente', como se usa con referencia al pH, indica un límite marginal de un máximo de 10 % por encima o por debajo del valor establecido. Sin embargo, preferentemente, el pH está dentro del 5 % por encima o por debajo del valor establecido.

15 Preferentemente, se agita el caldo de fermentación; preferentemente, se agita vigorosamente el caldo de fermentación. La agitación permite que los sustratos de azúcar circulen uniformemente alrededor de los organismos y aumenta la captación de azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios en los organismos para la conversión en el producto deseado. La agitación se puede lograr por cualquier medio adecuado conocido en la técnica, por ejemplo; técnicas Air-lift, tabiques deflectores, turbinas de cuchillas de Rushton o de disco, hélices abiertas de turbina o hélices marinas.

20 Como se ha mencionado anteriormente, el proceso puede comprender además la etapa de obtención de azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios a partir de biomasa, en donde el término 'biomasa' se define en el presente documento como materia vegetal o animal ya sea viva o previamente viva y se puede considerar que es materia residual o materia prevista para el uso que se describe en la presente invención.

Por tanto, según una realización adicional de un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso de producción de metacrilato de metilo o ácido metacrílico que comprende las etapas de:

- (i) obtención de azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios a partir de biomasa;
- 25 (ii) fermentación de dicho azúcares o glicerol para producir materias primas;
- (iii) formación de 2-butanona a partir de dichas materias primas;
- (iv) conversión de dicha 2-butanona en propionato de metilo usando una monooxigenasa de Baeyer-Villiger según el primer aspecto; y
- (v) tratamiento del propionato de metilo producido para obtener metacrilato de metilo o ácido metacrílico

30 Preferentemente, la biomasa usada comprende una alta cantidad de hidratos de carbono, son particularmente preferibles hidratos de carbono que son fuentes de glucosa tales como, pero no se limitan a: almidón, celulosa, glucógeno, arabinosilano, quitina o pectina.

35 Alternativamente, la biomasa usada comprende una alta cantidad de grasas, particularmente preferentemente son grasas o aceites que son fuentes de glicerol, específicamente triglicéridos. Los triglicéridos adecuados incluyen cualquier aceite o grasa que esté fácilmente disponible a partir de una fuente vegetal o animal. Los ejemplos de dichos aceites y grasas incluyen: aceite de palma, aceite de linaza, aceite de colza, manteca, mantequilla, aceite de arenque, aceite de coco, aceite vegetal, aceite de girasol, aceite de ricino, aceite de soja, aceite de oliva, manteca de cacao, suero de mantequilla, grasa de cetáceo, etc.

40 La biomasa puede estar compuesta de una o más fuentes de biomasa diferentes. Los ejemplos de fuentes de biomasa adecuadas son del siguiente modo: madera virgen, cultivos energéticos, residuos agrícolas, desperdicios de alimentos y residuos industriales o co-productos.

Las fuentes de biomasa de madera virgen pueden incluir, pero no se limitan a: astillas de madera; corteza; madera de poda; troncos; serrín; pellets o briquetas de madera.

45 Las fuentes de biomasa de cultivos energéticos pueden incluir, pero no se limitan a: monte bajo o silvicultura de rotación corta; pastos no leñosos tales como miscanto, cáñamo, pasto varilla, juncos o centeno; cultivos agrícolas tales como cultivos de azúcar, almidón o aceite; o plantas acuáticas tales como micro o macroalgas y malas hierbas.

Los residuos agrícolas pueden incluir, pero no se limitan a: cascarillas; paja; hojas y tallos de maíz; harina; granos; cama de aves de corral; estiércol; purín; o ensilaje.

50 Los desperdicios de alimentos pueden incluir, pero no se limitan a: peladura/piel; conchas; cáscaras; centros; pepitas/huesos; partes no comestibles de animales o peces; pulpa de la extracción de zumo y aceite; granos agotados o lúpulo de la producción de cerveza; residuos de cocinas domésticas; manteca o aceites o grasas.

Los residuos industriales pueden incluir, pero no se limitan a: madera no tratada que incluye paletas, madera tratada, materiales compuestos de madera que incluyen MDF/OSD, laminados de madera, pasta/trozos/residuos de papel; textiles que incluyen fibra/hilo/efluente; o compost.

5 En una realización preferida donde son deseables los azúcares, preferentemente la biomasa usada es una o una mezcla de diferentes fuentes lignocelulósicas. Más preferentemente, la biomasa usada es una o una mezcla de cultivos energéticos lignocelulósicos. Todavía más preferentemente, los cultivos energéticos lignocelulósicos usados son altos en hidratos de carbono derivados de azúcares básicos tales como glucosa, o maltosa, aún relativamente fáciles de cultivar a una alta tasa tales como pastos de rotación corta. Lo más preferentemente, la biomasa usada es pasto de miscanto.

10 En otra realización preferida donde se desea glicerol, preferentemente la biomasa usada es una o una mezcla de fuentes de triglicéridos. Más preferentemente, la biomasa usada es una o más de una mezcla de aceites o grasas. Todavía más preferentemente, los aceites o grasas usados se consiguen fácilmente de residuos animales y/o vegetales. Lo más preferentemente, la biomasa usada es aceite de palma.

15 Opcionalmente, se puede usar una fuente de biomasa mixta de cualquiera de la biomasa anteriormente enumerada de forma que se produzcan juntos azúcares y glicerol.

20 Preferentemente, los azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios se obtienen a partir de biomasa por la generación de un hidrolizado de materia prima de biomasa. Preferentemente, el hidrolizado contiene diversos azúcares y/o glicerol y/o gas convertible por microbios y otros subproductos o residuos celulares. Preferentemente, el hidrolizado se somete a diversas etapas de purificación antes de ser usado como un sustrato de azúcar/glicerol/gas para la fermentación, dichas etapas de purificación incluyen, pero no se limitan a: filtración, centrifugación y depuración química.

25 Preferentemente, los azúcares contenidos en el hidrolizado obtenido de la biomasa son monosacáridos o disacáridos que existen de forma natural. Dichos azúcares incluyen, pero no se limitan a: glucosa, fucosa, arabinosa, ribosa, rubulosa, alosa, altrosa, galactosa, xilosa, fructosa, gulosa, lixosa, manosa, ramnosa, treosa, talosa, iodoso, sacarosa, lactosa, lactulosa, maltosa, trehalosa, celubiosa, kojibiosa, nigerosa, isomaltosa, soforosa, laminaribiosa, gentiobiosa, turanosa, maltulosa, palatinosa, gentiobiulosa, manobiosa, melibiosa, rutinosa, rutinulosa o xilobiosa. Más preferentemente, los azúcares son glucosa o maltosa. Todavía más preferentemente, los azúcares son glucosa, particularmente D-glucosa.

30 Preferentemente, el hidrolizado se genera a partir de materias primas de biomasa por procesos tales como, pero no se limitan a: trituración mecánica, molienda, machacado, extrusión, tratamientos químicos tales como actividad ácido/base, exposición a vapor, o hidrólisis para liberar los azúcares y/o glicerol de los hidratos de carbono y triglicéridos, respectivamente. Esto puede ser particularmente necesario para fuentes leñosas de biomasa donde los grandes biopolímeros de celulosa y lignina deben ser descompuestos para llegar a los azúcares simples. Una vez se ha aislado y neutralizado el hidrolizado, entonces se mezcla preferentemente con agua, medios ricos o medios
35 mínimos para producir la forma básica del caldo de fermentación.

Lo más preferentemente, el hidrolizado siempre se somete a desionización para retirar cualquier traza de metales pesados que pueda actuar de inhibidores enzimáticos para los organismos que se van a usar en la etapa de fermentación.

40 Alternativamente, el hidrolizado se puede generar a partir de biomasa al mismo tiempo que la etapa de fermentación del proceso anterior, en vez de antes, tal como se conoce por el término 'SSF' que significa 'sacarificación y fermentación simultáneas'.

Según una realización particularmente preferida de un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso de producción de metacrilato de metilo o ácido metacrílico que comprende las etapas de:

- (i) obtención de glucosa y/o glicerol y/o gas convertible por microbios a partir de biomasa;
- 45 (ii) fermentación de dicho glucosa y/o glicerol y/o gas convertible por microbios en 2-butanol;
- (iii) conversión de dicho 2-butanol en 2-butanona;
- (iv) conversión de dicha 2-butanona en propionato de metilo usando una monooxigenasa de Baeyer-Villiger según el primer aspecto; y
- (v) tratamiento del propionato de metilo producido para obtener metacrilato de metilo o ácido metacrílico.

50 Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método de preparación de polímeros o copolímeros de metacrilato de metilo o ácido metacrílico que comprende las etapas de:

- (i) preparación de metacrilato de metilo o ácido metacrílico según el primer aspecto de la presente invención;

(ii) polimerización del metacrilato de metilo preparado en (i), opcionalmente con uno o más comonómeros, para producir sus polímeros o copolímeros.

Ventajosamente, dichos polímeros tendrán una porción apreciable, si no todo, de los residuos de monómero derivados de una fuente de biomasa renovable distinta de combustibles fósiles.

5 En cualquier caso, los comonómeros preferidos incluyen, por ejemplo, ácidos carboxílicos y ácidos dicarboxílicos monoetilénicamente insaturados y sus derivados, tales como ésteres, amidas y anhídridos.

Los comonómeros particularmente preferidos son ácido acrílico, acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de propilo, acrilato de n-butilo, acrilato de iso-butilo, acrilato de t-butilo, acrilato de 2-etilhexilo, acrilato de hidroxietilo, acrilato de iso-bornilo, ácido metacrílico, metacrilato de metilo, metacrilato de etilo, metacrilato de propilo, metacrilato de n-butilo, metacrilato de iso-butilo, metacrilato de t-butilo, metacrilato de 2-etilhexilo, metacrilato de hidroxietilo, metacrilato de laurilo, metacrilato de glicidilo, metacrilato de hidroxipropilo, metacrilato de iso-bornilo, metacrilato de dimetilaminoetilo, diacrilato de tripropilenglicol, estireno, α -metilestireno, acetato de vinilo, isocianatos que incluyen toluenodiisocianato y p,p'-metilendifenildiisocianato, acrilonitrilo, butadieno, butadieno y estireno (MBS) y ABS, a condición de que cualquiera de los comonómeros anteriores no sea el monómero seleccionado de ácido metacrílico o un éster de ácido metacrílico en (i) o (ii) anteriormente, en cualquier copolimerización dada de dicho monómero de ácido en (i) o dicho monómero de éster en (ii) con uno o más de los comonómeros.

También es posible, por supuesto, usar mezclas de diferentes comonómeros. Los propios comonómeros se pueden o no preparar por el mismo proceso que los monómeros de (i) anteriormente.

20 Se desvela un homopolímero o copolímero de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) formado a partir del método según el segundo aspecto de la presente invención.

Ventajosamente, la presente invención proporciona un proceso para la producción de MMA a partir de fuentes biológicas usando una enzima monooxigenasa de Baeyer-Villiger para catalizar la conversión anormal de la cetona alifática 2-butanona en propionato de metilo a un nivel industrialmente aplicable.

25 Todas las características contenidas en el presente documento se pueden combinar con cualquiera de los aspectos anteriores, en cualquier combinación que permita la formación de 2-butanona para la conversión en propionato de metilo usando una enzima BVMO.

Para un mejor entendimiento de la invención, y para mostrar cómo se pueden efectuar sus realizaciones, ahora se hará referencia, a modo de ejemplo, a las siguientes figuras y ejemplos en los que:

La Figura 1 muestra la conversión **de diferentes concentraciones de 2-butanona por CHMO 5 μ M.**

30 **Ejemplo 1 - Conversión por BVMO de 2-butanona en propionato de metilo**

Productos químicos y enzimas

35 Todos los productos químicos fueron de calidad analítica y se obtuvieron de Sigma Aldrich. Se expresó ciclohexanona monooxigenasa de *Acinetobacter* NCIMB 9871 (CHMO, EC 1.14.13.22) y se purificó fusionada al extremo N de una fosfito deshidrogenasa termoestable (PTDH, EC 1.20.1.1) para la regeneración de cofactor, como se ha descrito anteriormente.

Protocolo de biocatálisis

40 Se realizaron transformaciones en tubos de pírax de 15 mL. Los volúmenes de reacción (1 mL) contuvieron 2-butanona 5 mM, NADPH 100 μ M, Na_2HPO_3 10 mM y CHMO 5 μ M en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Se incubaron las mezclas a 24 °C con agitación orbital (200 rpm). Para determinar la conversión, se extrajo 1 mL de volumen de reacción con 0,5 mL de 1-octanol que contenía 0,1 % de mesitileno (1,3,5-trimetilbenceno) como patrón interno. Se extrajeron muestras por agitación con vórtex durante 1 min, seguido por una etapa de centrifugación (5000 rpm) durante 10 min. Se retiró la fase orgánica, se secó con MgSO_4 y se dispuso en un vial de cromatografía de gases (CG). El análisis de CG ocurrió en un instrumento Shimadzu GC acoplado con una columna Heliflex® AT™-5 (Grace Discovery Sciences). Se usó el siguiente perfil de temperatura para separar los componentes: 6 min a 40 °C seguido por un aumento hasta 250 °C a 20 °C por minuto. Se llevaron a cabo reacciones de blanco sin enzima y con cantidades variables de sustrato (2-butanona) y producto (propionato de metilo, acetato de etilo) en circunstancias idénticas y se usaron para preparar curvas de calibración para la identificación de producto y la determinación de conversión.

Análisis de CG

50 La siguiente Tabla 1 detalla el tiempo de separación de los compuestos por CG tras la extracción con 1-octanol + 0,1 % de mesitileno de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (columna AT-5, todos los compuestos 5 mM). Se pudieron separar de forma fiable los tres compuestos (1 sustrato y 2 productos) por CG.

Tabla 1. Tiempo de retención (TR) de compuestos después de la separación por CG. 5 mM de todos los compuestos extraídos de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 con 1-octanol + 0,1 % de mesitileno y realizado en columna de CG Heliflex AT-5 GC.

Compuesto	TR (min)
2-butanona	3,3
Acetato de etilo	3,5
Propionato de metilo	3,7
Mesitileno	10,85
Disolvente (1-octanol)	12,4

5 *Síntesis de propionato de metilo*

La Tabla 2 a continuación detalla la conversión de 2-butanona en acetato de etilo y propionato de metilo por CHMO. Se llevó a cabo regeneración de cofactor por el componente de fusión de CHMO PTDH (1). Claramente, se forma una cantidad industrialmente significativa de propionato de metilo después de 24 horas.

10 **Tabla 2.** Conversión de 2-butanona 5 mM por CHMO 5 μ M. Reacción en 1 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, que contiene NADPH 100 μ M y Na_2HPO_3 10 mM a temperatura ambiente durante 24 horas. Identificación y determinación de producto llevada a cabo por CG.

Producto	Conversión (%)
Acetato de etilo	40
Propionato de metilo	10

15 También se probaron enzimas BVMOs adicionales para la conversión de 2-butanona en propionato de metilo usando el método establecido anteriormente para CHMO en la Tabla 2. La Tabla 3 muestra los resultados de cribar diez enzimas BVMOs A-J que incluyen CHMO. Se forma una cantidad industrialmente significativa de propionato de metilo después de 20 horas para las enzimas BVMO, CPDMO y HAPMO.

20 **Tabla 3.** Conversión de 2-butanona 100 mM por CHMO 5 μ M. Reacción en 1 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, que contiene NADPH 100 μ M y Na_2HPO_3 10 mM a 24 °C durante 20 horas. Identificación y determinación de producto llevada a cabo por CG. El Ejemplo K es un control de 2-butanona con peróxido de hidrógeno.

Ejemplo	Enzima BVMO	Propionato de metilo (%)	Acetato de etilo (%)
A	PAMO	0,00	10,10
B	PAMO M446G	0,00	1,80
C	HAPMO	0,14	26,10
D	STMO	0,00	4,50
E	CPMO	0,00	7,70
F	CHMO	6,63	13,40
G	CPDMO	0,02	4,40
H	EtaA	0,00	0,00
I	PACHMO	0,00	0,00
J	PASTMO	0,00	5,50
K	2BO 100 mM + H_2O_2 25 mM	0,00	0,00

Ejemplo 2 - Efecto del sustrato sobre la conversión por BVMO de 2-butanona en propionato de metilo

La Figura 1 muestra que concentraciones de sustrato más altas dan más del producto anormal deseado. Por ejemplo: la incubación con 2-butanona 5 mM da una relación acetato de etilo : propionato de metilo de 5:1, y la incubación con 2-butanona 1000 mM da una relación de 1,5 : 1

5 **Ejemplos 3- 10**

Efecto de co-disolventes sobre la conversión de 2-butanona.

Se probaron diversos co-disolventes para su influencia sobre la relación de productos formados en la reacción de *Acinetobacter sp. DSM 17874* CHMO con 2-butanona. Como en el ejemplo previo, se observó que la 2-butanona 200 mM tenía un efecto positivo sobre esta relación. En particular, el aumentar la concentración de 2-butanona da como resultado la formación de más propionato de metilo, mejorando la relación acetato de etilo : propionato de metilo. Se probaron varios co-disolventes a esta concentración (200 mM). Como se puede apreciar de la Tabla 4, el metanol 200 mM tiene un efecto espectacular, invirtiendo completamente la relación en favor del propionato de metilo. En estas condiciones, se forma más propionato de metilo que acetato de etilo. Los otros co-disolventes probados también mostraron un efecto positivo. El dioxano, el 2-butanol, la acetona y el acetonitrilo tuvieron todos un efecto positivo significativo sobre la relación.

Tabla 4. **Efecto de diferentes co-disolventes sobre la relación de productos formados en la conversión de 2-butanona 5 mM por *Acinetobacter* CHMO.** Las conversiones se llevaron a cabo a 24 °C durante 18 h en 1 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. La concentración de enzima fue 8 µM.

Ejemplo	Relación acetato de etilo : propionato de metilo	Co-disolvente (todos: 200 mM)
3	4,77	ninguno
4	1,84	2-butanona
5	3,33	dioxano
6	4,42	terc-butanol
7	2,71	2-butanol
8	0,45	metanol
9	2,47	acetona
10	3,84	acetonitrilo

20 **Ejemplos 11-13**

También se estudió el efecto de los co-disolventes sobre la cantidad total de conversión, y se resalta en la Tabla 5. En algunos casos (dioxano, acetona y acetonitrilo), se forma significativamente más propionato de metilo, mientras que se forma menos acetato de etilo.

25 **Tabla 5. Efecto de diferentes co-disolventes sobre la conversión de 2-butanona en acetato de etilo y propionato de metilo por *Acinetobacter* CHMO.** La conversión con no co-disolvente se establece a 100 %. La conversión absoluta de la reacción con no co-disolvente, como se ha determinado por curvas de calibración, es acetato de etilo 4,1 mM y propionato de metilo 0,9 mM. Las conversiones se llevaron a cabo a 24 °C durante 18 h en 1 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. La concentración de enzima fue 8 µM, la concentración de 2-butanona fue 5 mM.

Ejemplo	Co-disolvente	Conversión relativa acetato de etilo (%)	Conversión relativa propionato de metilo (%)
	ninguno	100	100
	2-butanona	*	*
11	dioxano	89	128
12	acetona	66	127
13	acetonitrilo	89	110

* La conversión relativa no determinada como 2-butanona es el sustrato y la adición de 200 mM obviamente no permite el cálculo de conversión relativa sensible.

Para explicar la diferente eficiencia de extracción de los sustratos y productos en presencia de co-disolvente, se volvieron a realizar aquí calibraciones con co-disolvente para descartar diferencias significativas.

5 Ejemplos 14-16

Purificación de un novedoso conjunto de BVMOs y su cribado para la conversión de 2-butanona.

Se ha logrado la expresión en exceso y purificación de varias BVMOs diferentes, y se resume en la Tabla 6. Se clonaron todos los genes en el vector de fusión de fosfito deshidrogenasa pCRE3C y se expresaron en TOP10 de *E. coli*. Limitando la temperatura de cultivo hasta 17 °C se obtuvo una significativa expresión en exceso soluble para RmCHMO y XfCHMO. Se obtuvo expresión soluble significativa para BpCHMO. El protocolo de purificación implicó preparar extractos de células libres por sonicación en tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,4) con los siguientes aditivos: 10 % de glicerol, diotritol 0,5 mM, NaCl 100 mM e imidazol 25 mM.

15 **Tabla 6. Purificación de un novedoso conjunto de BVMOs y la conversión de 2-butanona.** Se incluyó CHMO de *Acinetobacter* en esta tabla como referencia. Se expresaron todas las otras BVMOs y se purificaron como se ha descrito anteriormente. Los rendimientos de todas las proteínas BVMOs purificadas variaron entre 10 y 20 mg de proteína por 100 mL de cultivo (caldo Terrific). Las conversiones se llevaron a cabo a 24 °C durante 18 h en 1 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 con 2-butanona 100 mM. En este experimento, la concentración de enzima varió: AcCHMO y XfCHMO 8 µM, RmCHMO 10 µM. Como la concentración de fosfito usada para la conversión fue limitante (25 mM), se usa este valor cuando se determina la conversión (es decir, 100 % de conversión = propionato de metilo 25 mM).

Ejemplo	BVMO	Purificada (P)	¿Forma propionato de metilo? (% de conversión)
14	AcCHMO	P	S (26 %)
15	RmCHMO	P	S (30 %)
16	XfCHMO	P	S (18 %)

AcCHMO: ciclohexanona monooxigenasa de *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871; XfCHMO, ciclohexanona monooxigenasa de *Xanthobacter flavus*; RmCHMO, ciclohexanona monooxigenasa de *Rhodococcus* sp. cepa HI-31.

25 Se clarificaron por centrifugación los extractos de células y se incubaron con resina Ni²⁺-sepharose durante 2 h a 4 °C. Se lavó el material de columna con el mismo tampón después de que se eluyera la proteína pura como una fracción amarilla concentrada (o como una banda pálida en el caso de enzimas enriquecidas) y se desaló por filtración en gel.

30 De modo tranquilizador, todas las CHMO que se purificaron presentaron actividad similar hacia 2-butanona, convirtiéndola en propionato de metilo y propionato de etilo, y todas las CHMO purificadas tuvieron la misma característica que cuando la concentración de 2-butanona aumentó la relación de los productos formados desplazada a favor del propionato de metilo. Los diferentes CHMOs tienen cantidades de conversión similares para propionato de metilo, pero no son idénticas las relaciones de productos formadas.

35 Como se apreciará, algunos ejemplos muestran el uso de diferentes enzimas BVMOs para producir propionato de metilo o acetato de etilo. En estos ejemplos, se muestra ventajosamente que las enzimas BVMOs particulares producen propionato de metilo a favor de acetato de etilo. Sin embargo, algunas de las enzimas BVMOs probadas no muestran conversión en absoluto, o solo conversión en acetato de etilo. Ventajosamente, los inventores también han descubierto que las enzimas BVMOs son sorprendentemente activas en la conversión anormal. En esta característica preferida de la invención, las enzimas BVMOs que no muestran conversión en propionato de metilo se pueden describir como ejemplos comparativos, es decir, Ejemplos A, B, D, E y H-J.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de producción de metacrilato de metilo o ácido metacrílico que comprende las etapas de:
 - (i) conversión de 2-butanona en propionato de metilo usando una monooxigenasa de Baeyer-Villiger, y
 - (ii) tratamiento del propionato de metilo producido para obtener metacrilato de metilo o ácido metacrílico;
- 5 en donde la monooxigenasa de Baeyer-Villiger se selecciona de una ciclohexanona monooxigenasa, una 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa o una ciclopentadecanona monooxigenasa.
2. Un proceso según la reivindicación 1, en donde el propionato de metilo se trata para producir metacrilato de metilo o ácido metacrílico por reacción con formaldehído o una fuente adecuada del mismo en presencia de un catalizador adecuado.
- 10 3. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la monooxigenasa de Baeyer-Villiger es una enzima natural y en donde fuentes bacterianas de la enzima monooxigenasa de Baeyer-Villiger natural son bacterias de los siguientes géneros bacterianos: *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Brachymonas*, *Nocardia*, *Exophiala*, *Brevibacterium*, *Gordonia*, *Novosphingobium*, *Streptomyces*, *Thermobifida*, *Xanthobacter*, *Mycobacterium*, *Comamonas*, *Thermobifida* o *Pseudomonas*, preferentemente, una enzima natural que deriva de las
- 15 especies bacterianas *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 o *Rhodococcus jostii* RHA1 o *Rhodococcus* sp. HI-31 o *Xanthobacter flavus* o *Brachymonas petroleovorans*.
4. Un proceso según cualquier reivindicación precedente, en donde la monooxigenasa de Baeyer-Villiger es una monooxigenasa de Baeyer-Villiger de tipo I seleccionada de uno de los siguientes grupos de enzimas: una
- 20 ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) número EC 1.14.13.22 (GenBank: BAA86293.1); una 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa (HAPMO) número EC 1.14.13.84 (GenBank: AAK54073.1); una ciclopentadecanona monooxigenasa (CPDMO) (GenBank: BAE93346.1).
5. Un proceso según cualquier reivindicación precedente, en donde la monooxigenasa de Baeyer-Villiger se selecciona de una de las siguientes enzimas: ciclohexanona monooxigenasa de *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB
- 25 9871, ciclohexanona monooxigenasas de *Xanthobacter flavus* (GenBank: CAD10801.1), ciclohexanona monooxigenasas de *Rhodococcus* sp. HI-31 (GenBank: BAH56677.1), ciclohexanona monooxigenasa de *Brachymonas petroleovorans* (GenBank: AAR99068.1), 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa (Swiss-Prot: Q93TJ5.1) o ciclopentadecanona monooxigenasa (GenBank: BAE93346.1).
6. Un proceso según cualquier reivindicación precedente, en donde la monooxigenasa de Baeyer-Villiger es una
- 30 ciclohexanona monooxigenasa seleccionada de: ciclohexanona monooxigenasa de *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871, ciclohexanona monooxigenasas de *Xanthobacter flavus* (GenBank: CAD10801.1), ciclohexanona monooxigenasas de *Rhodococcus* sp. HI-31 (GenBank: BAH56677.1) o ciclohexanona monooxigenasa de *Brachymonas petroleovorans* (GenBank: AAR99068.1).
7. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la monooxigenasa de Baeyer-Villiger es
- 35 una ciclohexanona monooxigenasa, más preferentemente ciclohexanona monooxigenasa que deriva de *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871, *Xanthobacter flavus* (GenBank: CAD10801.1) o *Rhodococcus* sp. HI-31 (GenBank: BAH56677.1), o preferentemente una 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa que deriva de *Pseudomonas fluorescens* o preferentemente una ciclopentadecanona monooxigenasa que deriva de *Pseudomonas* sp. HI-70.
8. Un proceso según cualquier reivindicación precedente, en donde al menos un co-disolvente se incluye en la
- 40 mezcla de reacción del proceso anterior, en donde el co-disolvente se selecciona de uno de los siguientes: metanol, 2-butanol, terc-butanol, dioxano, acetona o acetonitrilo, preferentemente el co-disolvente usado es metanol.
9. Un proceso según la reivindicación 8, en donde la concentración de co-disolvente/sustrato es 1000:1 o mayor en mol:mol de monooxigenasa de Baeyer-Villiger.
10. Un proceso según cualquier reivindicación precedente, en donde la relación de producción de propionato de metilo: acetato de etilo por la monooxigenasa de Baeyer-Villiger es al menos 1:5.
- 45 11. Un proceso según cualquier reivindicación precedente, en donde la monooxigenasa de Baeyer-Villiger convierte 2-butanona en propionato de metilo a un nivel absoluto de al menos 2 % de selectividad.
12. Un proceso según cualquier reivindicación precedente, en donde la monooxigenasa de Baeyer-Villiger convierte 2-butanona en propionato de metilo a un nivel relativo de al menos 20 %.
- 50 13. Un método de preparación de polímeros o copolímeros de metacrilato de metilo o ácido metacrílico que comprende las etapas de:
 - (i) preparación de metacrilato de metilo o ácido metacrílico según el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12;

(ii) polimerización del metacrilato de metilo preparado en (i), opcionalmente con uno o más comonómeros, para producir polímeros o sus copolímeros.

5 14. Un método según la reivindicación 13, en donde los comonómeros son ácidos carboxílicos y ácidos dicarboxílicos monoetilénicamente insaturados y sus derivados, que incluyen ésteres, amidas y anhídridos, preferentemente los comonómeros se seleccionan de: ácido acrílico, acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de propilo, acrilato de n-butilo, acrilato de iso-butilo, acrilato de t-butilo, acrilato de 2-etilhexilo, acrilato de hidroxietilo, acrilato de iso-bornilo, ácido metacrílico, metacrilato de metilo, metacrilato de etilo, metacrilato de propilo, metacrilato de n-butilo, metacrilato de iso-butilo, metacrilato de t-butilo, metacrilato de 2-etilhexilo, metacrilato de hidroxietilo, metacrilato de laurilo, metacrilato de glicidilo, metacrilato de hidroxipropilo, metacrilato de iso-bornilo, metacrilato de dimetilaminoetilo, diacrilato de tripropilenglicol, estireno, α -metilestireno, acetato de vinilo, isocianatos que incluyen toluenodiisocianato y p,p'-metilendifenildiisocianato, acrilonitrilo, butadieno, butadieno y estireno (MBS) y ABS, a condición de que cualquiera de los comonómeros anteriores no sea el monómero seleccionado de ácido metacrílico o un éster de ácido metacrílico en (i) o (ii) anteriormente en cualquier copolimerización dada de dicho monómero de ácido en (i) o dicho monómero de éster en (ii) con uno o más de los comonómeros.

15

Figura 1. Conversión de diferentes concentraciones de 2-butanona por CHMO 5 μM . Cada reacción en 1 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo NADPH 100 μM y Na_2HPO_3 10 mM a temperatura ambiente durante 24 horas.

