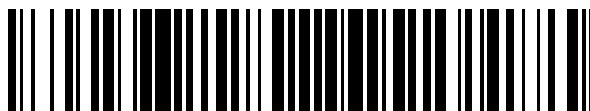


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 230**

51 Int. Cl.:

C12P 7/62 (2006.01)

C08L 67/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2013 PCT/US2013/062812**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2014 WO14058655**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2013 E 13777398 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 2906707**

54 Título: **Método de elaboración de copolímeros de polihidroxicanoato (3HB-co-4HB)**

30 Prioridad:

10.10.2012 US 201261711825 P
07.12.2012 US 201261734489 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2020

73 Titular/es:

CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
330 Dongho-ro, Jung-gu
Seoul 100-400, KR

72 Inventor/es:

RAMSEIER, THOMAS, MARTIN;
BICKMEIER, JEFFREY, A.;
FARMER, WILLIAM, R.;
MORSE, CATHERINE;
CHINNAPEN, HIMANI;
PEOPLES, OLIVER, P. y
SHABTAI, YOSSEF

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 747 230 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de elaboración de copolímeros de polihidroxicanoato (3HB-co-4HB)

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a métodos de elaboración de composiciones de copolímero de polihidroxicanoato, y más particularmente a métodos de elaboración de composiciones de copolímero de polihidroxicanoato que comprenden una pluralidad de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato, en los que las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato (i) comprenden monómeros de 3-hidroxiacetato y monómeros de 4-hidroxiacetato, (ii) tienen un porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxiacetato del 23,5 al 75%, (iii) tienen un contenido de base biológica de $\geq 80\%$, (iv) tienen un peso molecular promedio en peso de 250 kDa a 2,0 MDa, y además en los que la composición tiene una temperatura de transición vítrea de -60°C a -5°C . Dichos métodos comprenden cultivar un organismo que se ha modificado por ingeniería genética, incluyendo la incorporación estable de genes en presencia de uno o más materiales de partida de carbono.

Antecedentes

Los polihidroxicanoatos son materiales termoplásticos biodegradables y biocompatibles que pueden producirse a partir de recursos renovables y que tienen una amplia gama de aplicaciones industriales y biomédicas. Los polihidroxicanoatos pueden producirse como homopolímeros, tales como poli-3-hidroxiacetato (también denominado "PHB") y poli-4-hidroxiacetato (también denominado "P4HB"), o como copolímeros, tales como poli(3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato) (también denominado "PHB-co-4HB"). Los copolímeros de poli(3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato) son de interés por su potencial de producirse a partir de recursos renovables y de usarse para conferir elasticidad similar al caucho en combinaciones de polímeros. Por tanto, por ejemplo, la producción de poli(3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato) con altas cantidades de incorporación de monómero de 4HB en el copolímero se ha descrito previamente en la bibliografía usando diversos microorganismos, pero esto sólo se logró cuando se proporcionaron precursores inmediatos de 4-hidroxiacetil-CoA, tales como por ejemplo 4-hidroxiacetato, γ -butirolactona y/o 1,4-butanodiol con otras fuentes de carbono. Por ejemplo, Kunioka *et al.*, Polymer Communications 29:174-176 (1988); Doi *et al.*, Polymer Communications 30:169-171 (1989); Kimura *et al.*, Biotechnol. Letters 14(6):445-450 (1992); Nakamura *et al.*, Macromolecules 25(17):4237-4241 (1992); Saito y Doi, Int. J. Biol. Macromol. 16(2):99-104 (1994); Lee *et al.*, Biotechnol. Letters 19(8):771-774 (1997); Choi *et al.*, Appl. Environm. Microbiol. 65(4):1570-1577 (1999); Hsieh *et al.*, J. Taiwan Inst. Chem. Engin. 40:143-147 (2009). La producción de copolímero de poli(3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato) a partir de glucosa como única fuente de carbono en células de *Escherichia coli* modificadas por ingeniería genética también se ha logrado, pero los porcentajes molares monoméricos notificados de monómeros de 4-hidroxiacetato de los copolímeros resultantes han sido bajos, por ejemplo del 12,5% o menos durante la fase estacionaria, a menos que se alimenten conjuntamente otras fuentes de carbono. Chen *et al.*, publicación estadounidense n.º 2012/0214213; véase también Dennis y Valentin, patente estadounidense n.º 6.117.658; Valentin y Dennis, J. Biotechnol. 58:33-38 (1997), Chen *et al.*, solicitud de patente china CN 102382789 A; Li *et al.*, Metab. Eng. 12:352-359 (2010). La producción de homopolímero de poli-4-hidroxiacetato a partir de una biomasa microbiana modificada por ingeniería genética que metaboliza una materia prima renovable, tal como glucosa, también se ha descrito, pero los títulos de homopolímero de poli-4-hidroxiacetato a modo de ejemplo fueron de menos del 50% en peso de los títulos de biomasa, y en cualquier caso el homopolímero de poli-4-hidroxiacetato no tenía las mismas propiedades que el copolímero de poli(3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato). Van Walsem *et al.*, documento WO 2011/100601.

Zheng-Jun Li *et al.* (Metabolic Engineering 12 (2010) 352-359) dan a conocer el uso de plásmidos inestables para la transformación de *E. coli*, con el fin de obtener un microorganismo modificado por ingeniería genética útil para la producción de poli(3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato) [P(3HB-co-4HB)] a partir de fuentes de carbono no relacionadas. La *E. coli* modificada metabólicamente produjo P(3HB-co-4HB al 11,1% en moles) usando glucosa como fuente de carbono. La presencia de alfa-cetoglutarato o citrato potenció el contenido de monómero de 4HB desde el 11,1% hasta el 22,61%.

El documento EP 2855584 (fecha de publicación: 12 de diciembre de 2013) da a conocer una composición de polímero biodegradable ramificado que comprende una combinación de (a) poli(ácido láctico); y (b) un polímero de polihidroxicanoato (PHA) biodegradable que tiene una temperatura de transición vítrea de entre aproximadamente -5°C y aproximadamente -50°C y un peso molecular de entre 450 y 1500 kDa. El polímero de PHA es un copolímero de (i) 3-hidroxiacetato; y (ii) uno o más monómeros seleccionados de 4-hidroxiacetato, 5-hidroxiacetato, 3-hidroxihexanoato y 3-hidroxiacetato, en el que el uno o más monómeros son de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 85% del peso del polímero de PHA. El documento EP 2855584 no da a conocer métodos de elaboración de composiciones de copolímero de polihidroxicanoato, cuyos métodos que comprenden cultivar un organismo modificado por ingeniería genética.

Sumario

Se proporciona un método de elaboración de una composición de copolímero de polihidroxicanoato. La

composición comprende una pluralidad de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato. Las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato (i) comprenden monómeros de 3-hidroxicanoato y monómeros de 4-hidroxicanoato, (ii) tienen un porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxicanoato del 23,5 al 75%, (iii) tienen un contenido de base biológica de $\geq 80\%$ y (iv) tienen un peso molecular promedio en peso de 250 kDa a 2,0 MDa. Además, la composición tiene una temperatura de transición vítrea de -60°C a -5°C . El método comprende cultivar un organismo en presencia de uno o más materiales de partida de carbono en condiciones en las que (a) el uno o más materiales de partida de carbono se convierten en 3-hidroxicanoil-CoA y 4-hidroxicanoil-CoA y (b) la 3-hidroxicanoil-CoA y la 4-hidroxicanoil-CoA se polimerizan para formar las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato, formando de ese modo la composición. El organismo se ha modificado por ingeniería genética mediante la incorporación estable de genes que codifican para una polihidroxicanoato sintasa, una acetil-CoA acetiltransferasa, una acetoacetil-CoA reductasa, una succinato-semialdehído deshidrogenasa, una semialdehído succínico reductasa y una CoA transferasa, y para no comprender actividades enzimáticas de o bien una succinato-semialdehído deshidrogenasa dependiente de NAD^{+} o bien una succinato-semialdehído deshidrogenasa dependiente de NADP^{+} o ambas. El uno o más materiales de partida de carbono, tomados juntos, tienen un contenido de base biológica de $\geq 80\%$.

Breve descripción del dibujo

La figura 1 es un diagrama esquemático de las rutas metabólicas centrales de *E. coli* a modo de ejemplo que muestra reacciones que se modificaron o introdujeron en los ejemplos o que podrían modificarse en el futuro. Las reacciones que se eliminaron delectando los genes correspondientes en determinados ejemplos están marcadas con una "X". Abreviaturas: "PEP", fosfoenolpiruvato; "PYR", piruvato; "Ac-CoA", acetil-CoA; "AcAc-CoA", acetoacetil-CoA; "3HB-CoA", 3-hidroxicanoil-CoA; "CIT", citrato; "ICT", isocitrato; "aKG", alfa-cetoglutarato; "SUC-CoA", succinil-CoA; "SUC", succinato; "Fum", fumarato; "MAL", L-malato; "OAA", oxaloacetato; "SSA", semialdehído succínico; "4HB", 4-hidroxicanoato; "4HB-P", 4-hidroxicanoil-fosfato; "4HB-CoA", 4-hidroxicanoil-CoA; "PHB-co-4HB", poli(3-hidroxicanoato-co-4-hidroxicanoato). Reacciones numeradas: "1", acetil-CoA acetiltransferasa (también conocida como beta-cetotiolasa); "2", acetoacetil-CoA reductasa; "3", succinato-semialdehído deshidrogenasa; "4", alfa-cetoglutarato descarboxilasa; "5", semialdehído succínico reductasa; "6", CoA transferasa; "7", butirato cinasa; "8", fosfotransbutirilasa; "9", polihidroxicanoato sintasa; "10", succinato-semialdehído deshidrogenasa; "11", fosfoenolpiruvato carboxilasa; "12", 4-hidroxicanoil-CoA-tioesterasa.

Descripción detallada

La invención se refiere a un método de elaboración de una composición de copolímero de polihidroxicanoato. La composición resultante comprende una pluralidad de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato. La composición puede ser, por ejemplo, una composición de biomasa, por ejemplo un organismo que ha producido, y comprende en la misma, la pluralidad de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato, una composición libre de biomasa distinta a polihidroxicanoato, por ejemplo una composición que comprende moléculas de copolímero de polihidroxicanoato que se han aislado y/o purificado a partir de un organismo que ha producido las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato, o una composición bioplástica, por ejemplo una composición homogénea o combinada que comprende las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato y adecuada para su uso como bioplástico.

Las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato comprenden monómeros de 3-hidroxicanoato y monómeros de 4-hidroxicanoato. Por consiguiente, cada molécula de copolímero de polihidroxicanoato comprende tanto monómeros de 3-hidroxicanoato como monómeros de 4-hidroxicanoato. Tales moléculas pueden sintetizarse, por ejemplo, mediante copolimerización mediada por PHA-sintasa de 3-hidroxicanoil-CoA y 4-hidroxicanoil-CoA para dar moléculas del copolímero, por ejemplo copolímero de poli(3-hidroxicanoato-co-4-hidroxicanoato). Se describen PHA sintasas adecuadas en los ejemplos a continuación. Cada molécula de copolímero de polihidroxicanoato también puede comprender opcionalmente monómeros adicionales, por ejemplo monómeros de 5-hidroxicanoato, por ejemplo basándose en la presencia adicional de precursores polimerizables de los monómeros adicionales durante la copolimerización mediada por PHA-sintasa de 3-hidroxicanoil-CoA y 4-hidroxicanoil-CoA.

Las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato tienen un porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxicanoato del 23,5 al 75%. Por consiguiente, del 23,5 al 75% de las unidades monoméricas de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato, tomadas juntas, son monómeros de 4-hidroxicanoato, con del 25 al 76,5% restante de las unidades monoméricas de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato correspondiente a monómeros de 3-hidroxicanoato y opcionalmente monómeros adicionales. Preferiblemente, sustancialmente todo, por ejemplo $\geq 95\%$ o $\geq 99\%$, del 25 al 76,5% restante de las unidades monoméricas corresponde a monómeros de 3-hidroxicanoato, correspondiendo el resto a monómeros adicionales. Preferiblemente, todo del 25 al 76,5% restante de las unidades monoméricas corresponde a monómeros de 3-hidroxicanoato, de modo que las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato no incluyen monómeros adicionales. Por tanto, por ejemplo con respecto al copolímero de poli(3-hidroxicanoato-co-4-hidroxicanoato) en particular, del 25 al 76,5% restante de las unidades monoméricas de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato corresponde a monómeros de 3-hidroxicanoato. Los métodos adecuados a modo de ejemplo para determinar el porcentaje molar monomérico de monómeros de 3-hidroxicanoato y monómeros de 4-hidroxicanoato de moléculas de copolímero de

polihidroxicanoato se describen en los ejemplos a continuación.

En algunas realizaciones, el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxicanoato de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato elaborado según la invención puede ser del 25 al 70%. El porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxicanoato de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato puede ser, por ejemplo, del 30 al 40%, del 40 al 50%, del 50 al 60% o del 60 al 70%.

Los porcentajes molares monoméricos de monómeros de 4-hidroxicanoato de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato afectan a las propiedades de las composiciones de los mismos, por ejemplo con respecto a temperaturas de fusión, elongación a la rotura, temperaturas de transición vítrea, y similares. Por ejemplo, cuando los porcentajes molares monoméricos de monómeros de 4-hidroxicanoato de moléculas de copolímero de poli(3-hidroxicanoato-co-4-hidroxicanoato) aumentan por encima del 10%, la temperatura de fusión disminuye por debajo de 130°C y la elongación a la rotura aumenta por encima del 400%. Saito Y. *et al.*, 39 Polym. Int. 169 (1996). Por tanto, pueden usarse las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato que tienen porcentajes molares monoméricos de monómeros de 4-hidroxicanoato en cada uno de los diversos intervalos dados a conocer anteriormente para modificar por ingeniería composiciones para que tengan propiedades deseadas particulares.

Las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato tienen un contenido de base biológica de $\geq 80\%$. Contenido de base biológica, tal como se usa el término en el presente documento, significa la cantidad de carbono de base biológica en un material o producto como porcentaje del peso (masa) del carbono orgánico total del material o producto, tal como se define en la norma ASTM D6866-12, métodos de prueba convencionales para determinar el contenido de base biológica de muestras sólidas, líquidas y gaseosas usando análisis de radiocarbono (ASTM International, EE.UU., 2012). Tal como se comenta en la norma ASTM D6866-12, el carbono orgánico total puede incluir tanto carbono de base biológica como carbono fósil. El carbono de base biológica corresponde a carbono orgánico que incluye radiocarbono, es decir ^{14}C , en una cantidad indicativa de ciclos recientes a través de la biosfera, por ejemplo incorporación reciente de CO_2 atmosférico, incluyendo un porcentaje conocido de ^{14}C , en carbono orgánico. El carbono fósil corresponde a carbono orgánico que incluye poco o ningún radiocarbono porque la edad del carbono fósil, cuando se mide a partir de la fecha de incorporación de CO_2 atmosférico, es mucho mayor que la semivida de ^{14}C , es decir todo o esencialmente todo el ^{14}C que se había incorporado se ha descompuesto. Por consiguiente, cuando se aplica a las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato, contenido de base biológica significa la cantidad de carbono de base biológica en las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato como porcentaje del peso (masa) del carbono orgánico total de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato. El contenido de base biológica de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato puede medirse, por ejemplo, según la norma ASTM D6866-12, basándose en la determinación del contenido de ^{14}C y ^{12}C en el CO_2 derivado de la combustión del polihidroxicanoato, y corrigiendo la inyección de ^{14}C por la bomba posterior a 1950 en la atmósfera, entre otros métodos. Por tanto, las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato tienen un contenido de base biológica de $\geq 80\%$ tal como se mide según la norma ASTM D6866-12. También pueden usarse otros enfoques adecuados para medir el contenido de base biológica tal como se conoce en la técnica. Las diferencias en el contenido de base biológica entre diferentes moléculas de copolímero de polihidroxicanoato son indicativas de diferencias estructurales, es decir, diferencias en las razones de ^{14}C respecto a ^{12}C de las mismas, entre las diferentes moléculas de copolímero de polihidroxicanoato.

En algunas realizaciones, el contenido de base biológica de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato elaborado según la invención es $\geq 95\%$. Preferiblemente, el contenido de base biológica de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato es $\geq 99\%$. Por tanto, por ejemplo, el contenido de base biológica de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato puede ser $\geq 95\%$, o $\geq 99\%$ o del 100% en cada caso, de nuevo tal como se mide según la norma ASTM D6866-12.

Las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato que tienen el contenido de base biológica indicado anteriormente pueden usarse para la fabricación de plásticos de base biológica en los que la mayoría o todo el carbono fósil se ha reemplazado por carbono de base biológica renovable, con beneficios adicionales acompañantes. Además, las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato que tienen el contenido de base biológica indicado anteriormente pueden distinguirse fácilmente de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato y otros polímeros y compuestos que no tienen el contenido de base biológica indicado anteriormente, basándose en las diferencias estructurales indicadas anteriormente asociadas con diferencias en el contenido de base biológica, con beneficios reguladores acompañantes.

Las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato tienen un peso molecular promedio en peso de 250 kilodalton ("kDa") a 2,0 megadalton ("MDa"). Las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato pueden producirse en una distribución con respecto a sus pesos moleculares, y las propiedades físicas y propiedades reológicas de las composiciones de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato pueden depender de la distribución. Los pesos moleculares de polímeros pueden calcularse de diversas formas. El peso molecular promedio en peso, también denominado M_w , es la suma de los pesos de las diversas longitudes de cadena por el peso molecular de la cadena, dividido entre el peso total de todas las cadenas ($\sum N_i M_i^2 / \sum N_i M_i$). El peso molecular promedio en número, también denominado M_n , es la suma del número de cadenas de una longitud dada por el peso molecular de la cadena, dividido entre el número total de cadenas ($\sum N_i M_i / \sum N_i$). El índice de polidispersidad proporciona una medición

de la amplitud de una distribución de peso molecular de un polímero y se calcula como el peso molecular promedio en peso dividido entre el peso molecular promedio en número. Tal como se usa en el presente documento, el término peso molecular se refiere a peso molecular promedio en peso a menos que el contexto indique lo contrario.

5 El peso molecular promedio en peso de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato puede determinarse, por ejemplo, mediante el uso de dispersión de luz y cromatografía de permeación en gel con patrones de poliestireno. Puede usarse cloroformo tanto como el eluyente para la cromatografía de permeación en gel y como el diluyente para los polihidroxicanoatos. Pueden generarse curvas de calibración para determinar pesos moleculares usando poliestirenos lineales como patrones de peso molecular y un método de calibración basado en el logaritmo del peso

10 molecular en función del volumen de elución.

En algunas realizaciones, el peso molecular promedio en peso de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato elaboradas según la invención es de 1,5 MDa a 2,0 MDa, por ejemplo tal como se determina mediante el uso de dispersión de luz y cromatografía de permeación en gel con patrones de poliestireno. Preferiblemente, el peso molecular promedio en peso de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato es de 1,7 MDa a 2,0 MDa, por ejemplo de nuevo tal como se determina mediante el uso de dispersión de luz y cromatografía de permeación en gel con patrones de poliestireno.

15

Inesperadamente, se ha observado en este caso que las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato que tienen un porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato del 23,5 al 75%, por ejemplo del 25 al 70%, del 30 al 40%, del 40 al 50%, del 50 al 60% o del 60 al 70%, pueden obtenerse en títulos de polihidroxicanoato $\geq 50\%$ en peso de títulos de biomasa según los métodos descritos a continuación, por ejemplo cultivar un organismo en presencia de uno o más materiales de partida de carbono, tal como se comenta a continuación, en el que el organismo se ha modificado por ingeniería genética, tal como se comenta también a continuación. Más específicamente, se ha observado que las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato pueden obtenerse en títulos de polihidroxicanoato que superan el 50% en peso de títulos de biomasa cultivando el organismo en presencia de glucosa como única fuente de carbono, y por tanto en ausencia de compuestos que son precursores inmediatos de 4-hidroxitirato-CoA y/o compuestos que se fabrican normalmente a partir de recursos no renovables. También se ha observado que durante el cultivo de un organismo, no modificado por ingeniería genética, en presencia de glucosa y 1,4-butanodiol, que es un compuesto que es tanto un precursor inmediato de 4-hidroxitirato-CoA como fabricado normalmente a partir de recursos no renovables, aumentando la cantidad de 1,4-butanodiol, mientras es útil para lograr porcentajes molares monoméricos relativamente mayores de monómeros de 4-hidroxitirato de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato, da como resultado rendimientos relativamente menores de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato y pesos moleculares promedio en peso relativamente menores de las mismas. Sin desear limitarse por la teoría, se cree que los títulos de polihidroxicanoato $\geq 50\%$ en peso de títulos de biomasa de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato que pueden obtenerse mediante los métodos descritos a continuación son indicativos de pesos moleculares inesperadamente mayores asociados con las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato. Las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato que tienen pesos moleculares promedio en peso en los intervalos indicados anteriormente pueden usarse para preparar composiciones de copolímero de polihidroxicanoato que tienen propiedades físicas y propiedades reológicas deseadas.

20

25

30

35

40

La composición resultante tiene una temperatura de transición vítrea de -60°C a -5°C . La temperatura de transición vítrea es la temperatura por encima de la que las moléculas de polímero comienzan movimientos moleculares coordinados. Físicamente, el módulo del polímero comienza a caer varios órdenes de magnitud hasta que el polímero alcanza finalmente un estado gomoso. Preferiblemente, la temperatura de transición vítrea de la composición es, por ejemplo, de -50°C a -15°C , de -50°C a -20°C o de -45°C a -15°C . Las composiciones que tienen temperaturas de transición vítrea en los intervalos indicados anteriormente pueden usarse para garantizar que las composiciones están en un estado gomoso a las temperaturas de uso deseadas.

45

50

La composición puede ser una en la que el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato no disminuye con el peso molecular creciente de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato. Tal como se indicó anteriormente, las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato pueden producirse en una distribución con respecto a sus pesos moleculares. Los porcentajes molares monoméricos de monómeros de 4-hidroxitirato pueden variar entre moléculas de copolímero de polihidroxicanoato individuales. Una composición en la que el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato no disminuye con el peso molecular creciente de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato puede ser, por ejemplo, una composición en la que el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato en el extremo superior de la distribución de peso molecular no es menor que el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato en el extremo inferior de la distribución de peso molecular. Por tanto, por ejemplo, la composición puede ser una en la que el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato no varía sustancialmente, por ejemplo para nada, con el peso molecular creciente de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato, por ejemplo el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato en el extremo superior de la distribución de peso

55

60

65

molecular es esencialmente el mismo, por ejemplo idéntico, al de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato en el extremo inferior de la distribución de peso molecular. Además por ejemplo, la composición puede ser una en la que el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato aumenta con el peso molecular creciente de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato, por ejemplo el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato en el extremo superior de la distribución de peso molecular es mayor que el de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato en el extremo inferior de la distribución de peso molecular.

Inesperadamente, se ha observado en este caso que las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato que tienen un porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato del 23,5 al 75%, y más particularmente de aproximadamente el 50 al 60%, pueden obtenerse en formas en las que los porcentajes molares monoméricos de monómeros de 4-hidroxitirato de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato de un cultivo de un organismo no disminuyen durante las etapas posteriores del cultivo del organismo, por ejemplo durante la fase estacionaria, según los métodos descritos a continuación, por ejemplo cultivar un organismo en presencia de uno o más materiales de partida de carbono, tales como glucosa como única fuente de carbono, tal como se comenta a continuación, en el que el organismo se ha modificado por ingeniería genética, tal como se comenta también a continuación. También se ha observado que durante el cultivo de un organismo no modificado por ingeniería genética, en presencia de glucosa y 1,4-butanodiol, cantidades decrecientes de 1,4-butanodiol que son típicas de etapas posteriores de tal cultivo (por ejemplo, reflejando el consumo de la mayoría del 1,4-butanodiol que había estado presente) dan como resultado porcentajes molares monoméricos decrecientes de monómeros de 4-hidroxitirato de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato de un cultivo del organismo con pesos moleculares promedio en peso crecientes concomitantes de las moléculas de copolímero. Sin desear limitarse a la teoría, se cree que la ausencia de una disminución del porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato de un cultivo de un organismo durante las etapas posteriores del cultivo del organismo, según los métodos descritos a continuación, es indicativa de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato en las que el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato no disminuye con el peso molecular creciente de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato. Las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato en las que el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato no disminuye con el peso molecular creciente de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato pueden usarse para garantizar propiedades físicas y estructurales consistentes de composiciones de las mismas.

La composición resultante es una en la que las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato se producen en un proceso de fermentación usando uno o más materiales de partida de carbono que, tomados juntos, tienen un contenido de base biológica de $\geq 80\%$; comprendiendo el uno o más materiales de partida de carbono preferiblemente una fuente de carbono seleccionada del grupo que consiste en glucosa, levoglucosano, sacarosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa, arabinosa, y mezclas de los mismos; y el rendimiento es mayor de 0,25 g de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato por gramo de la fuente de carbono. Por ejemplo, el rendimiento puede ser mayor de 0,30 g, o mayor de 0,35 g, o mayor de 0,40 g, de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato por gramo de la fuente de carbono.

Los métodos de elaboración de estas composiciones de copolímero de polihidroxicanoato, tal como se describió anteriormente, se dan a conocer a continuación.

También se da a conocer una composición de combinación de polímeros en el presente documento. La composición de combinación de polímeros comprende una composición de polihidroxicanoato y una pluralidad de moléculas de un segundo polímero. La composición de polihidroxicanoato puede ser cualquiera de las composiciones de polihidroxicanoato tal como se describió anteriormente, concretamente moléculas de copolímero de polihidroxicanoato, en la que las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato (i) comprenden monómeros de 3-hidroxitirato y monómeros de 4-hidroxitirato, (ii) tienen un porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato del 23,5 al 75%, (iii) tienen un contenido de base biológica de $\geq 80\%$, (iv) tienen un peso molecular promedio en peso de 250 kDa a 2,0 MDa, y además en la que la composición tiene una temperatura de transición vítrea de -60°C a -5°C . Además, la composición de polihidroxicanoato puede ser una, por ejemplo, en la que (a) el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato es del 25 al 70%, del 30 al 40%, del 40 al 50%, del 50 al 60% o del 60 al 70%, (b) el contenido de base biológica de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato es $\geq 95\%$, $\geq 99\%$ o del 100%, (c) las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato tienen un peso molecular promedio en peso de 1,5 MDa a 2,0 MDa, o de 1,7 MDa a 2,0 MDa, (d) la composición tiene una temperatura de transición vítrea de -50°C a -15°C , de -50°C a -20°C o de -45°C a -15°C , (e) el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato no disminuye con el peso molecular creciente de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato.

El segundo polímero puede ser, por ejemplo, un polímero de base biológica o un polímero de base no biológica. Los polímeros de base biológica adecuados incluyen, por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(succinato de butileno), poli(succinato-adipato de butileno), poli(tereftalato-adipato de butileno) y/o poli(carbonato de propileno), en los que

los polímeros de los plásticos de base biológica se derivan de ácido succínico de base biológica, ácido adípico de base biológica, 1,4-butanodiol de base biológica, poli(óxido de propileno) de base biológica y/o dióxido de carbono. Los polímeros de base biológica adecuados también incluyen, por ejemplo, polihidroxialcanoatos adicionales distintos de copolímero de poli(3-hidroxitirato-co-4-hidroxitirato), tales como, por ejemplo, homopolímeros tales como homopolímero de poli-3-hidroxitirato y homopolímero de poli-4-hidroxitirato, otros copolímeros, tales como poli-3-hidroxitirato-co-hidroxitirato y poli-3-hidroxitirato-co-3-hidroxihexanoato, y combinaciones de éstos y otros polihidroxialcanoatos. Los polímeros de base no biológica adecuados incluyen, por ejemplo, poli(cloruro de vinilo).

La composición de combinación de polímeros puede usarse para una amplia variedad de aplicaciones, por ejemplo película de empaquetamiento, basándose en la optimización de las propiedades mecánicas (por ejemplo, resistencia a la tracción, resistencia a la punción y elongación), propiedades térmicas (por ejemplo, temperatura de distorsión térmica) y/o propiedades ópticas (por ejemplo, claridad). La composición de combinación de polímeros en la que el segundo polímero es un polímero de base biológica puede usarse, en particular, para optimizar las propiedades de rendimiento y para lograr un alto contenido de base biológica. La composición de combinación de polímeros en la que el segundo polímero es poli(cloruro de vinilo) tiene propiedades mejoradas incluyendo procesamiento mejorado en comparación con poli(cloruro de vinilo) solo. La composición de combinación de polímeros puede combinarse mediante métodos adecuados que se conocen en la técnica.

La composición de combinación de polímeros puede ser una, por ejemplo, en la que las moléculas de copolímero de polihidroxialcanoato están presentes a del 5 al 95% en peso de la composición de combinación de polímeros. Por ejemplo, la composición de combinación de polímeros puede ser una en la que las moléculas de copolímero de polihidroxialcanoato están presentes a del 20 al 40% en peso, del 25 al 35% en peso o del 28 al 33% en peso, de la composición de combinación de polímeros. La composición de combinación de polímeros también puede ser, por ejemplo, continua o cocontinua. La composición de combinación de polímeros también puede ser una, por ejemplo, en la que las moléculas de copolímero de polihidroxialcanoato y las moléculas del segundo polímero forman una única fase, por ejemplo en la que el segundo polímero es poli(cloruro de vinilo). La composición de combinación de polímeros también puede ser una, por ejemplo, en la que las moléculas de copolímero de polihidroxialcanoato y las moléculas del segundo polímero forman más de una única fase, por ejemplo en la que el segundo polímero es poli(ácido láctico). La composición de combinación de polímeros también puede tener, por ejemplo, una menor capacidad de cristalización, es decir cristalinidad teórica máxima, que una composición correspondiente que carece de las moléculas de copolímero de polihidroxialcanoato.

También se da a conocer una composición de biomasa en el presente documento. La composición de biomasa comprende una composición de polihidroxialcanoato, por ejemplo cualquiera de las composiciones de polihidroxialcanoato tal como se describió anteriormente, en la que las moléculas de copolímero de polihidroxialcanoato están presentes a $\geq 50\%$ en peso de la composición de biomasa. Por tanto, de nuevo, la composición de copolímero de polihidroxialcanoato es una que comprende una pluralidad de moléculas de copolímero de polihidroxialcanoato, en la que las moléculas de copolímero de polihidroxialcanoato (i) comprenden monómeros de 3-hidroxitirato y monómeros de 4-hidroxitirato, (ii) tienen un porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato del 23,5 al 75%, (iii) tienen un contenido de base biológica de $\geq 80\%$, (iv) tienen un peso molecular promedio en peso de 250 kDa a 2,0 MDa, y además en la que la composición tiene una temperatura de transición vítrea de -60°C a -5°C . Además, la composición de polihidroxialcanoato puede ser una, por ejemplo, en la que (a) el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato de las moléculas de copolímero de polihidroxialcanoato es del 25 al 70%, del 30 al 40%, del 40 al 50%, del 50 al 60% o del 60 al 70%, (b) el contenido de base biológica de las moléculas de copolímero de polihidroxialcanoato es $\geq 95\%$, $\geq 99\%$ o del 100%, (c) las moléculas de copolímero de polihidroxialcanoato tienen un peso molecular promedio en peso de 1,5 MDa a 2,0 MDa, o de 1,7 MDa a 2,0 MDa, (d) la composición tiene una temperatura de transición vítrea de -50°C a -15°C , de -50°C a -20°C o de -45°C a -15°C , (e) el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxitirato de las moléculas de copolímero de polihidroxialcanoato no disminuye con el peso molecular creciente de las moléculas de copolímero de polihidroxialcanoato.

Tal como se indica, las moléculas de copolímero de polihidroxialcanoato están presentes a $\geq 50\%$ en peso de la composición de biomasa. Tal como se usa en el presente documento, % en peso de la composición de biomasa se refiere al peso seco de la composición de biomasa, por ejemplo peso seco celular. Las moléculas de copolímero de polihidroxialcanoato pueden estar presentes, por ejemplo, a ≥ 60 , ≥ 70 , ≥ 80 , ≥ 85 o $\geq 90\%$ en peso de la composición de biomasa.

El método comprende cultivar un organismo modificado por ingeniería genética en presencia de uno o más materiales de partida de carbono en condiciones en las que (a) el uno o más materiales de partida de carbono se convierten en 3-hidroxitirato-CoA y 4-hidroxitirato-CoA y (b) la 3-hidroxitirato-CoA y la 4-hidroxitirato-CoA se polimerizan para formar las moléculas de copolímero de polihidroxialcanoato, formando de ese modo la composición.

El cultivo puede comprender, por ejemplo, cultivar el organismo mediante fermentación, cultivo en matraces con agitación, y similares. Puede llevarse a cabo la fermentación, por ejemplo, a escalas que oscilan entre escala de

laboratorio, por ejemplo 1 l, y escala de fabricación industrial, por ejemplo de 20.000 a 100.000 l. En los ejemplos a continuación se describen enfoques de cultivo adecuados adicionales.

5 El organismo puede ser, por ejemplo, una cepa microbiana o una cepa de alga. Las cepas microbianas adecuadas incluyen, por ejemplo, una cepa de *Escherichia coli* o una cepa de *Ralstonia eutropha*. Las cepas de algas adecuadas incluyen, por ejemplo, una cepa de *Chlorella*. Se describen organismos adecuados adicionales en los ejemplos a continuación.

10 El uno o más materiales de partida de carbono pueden comprender un material de partida de carbono que puede usarse en un proceso industrial, por ejemplo para proporcionar carbono u otra fuente de energía a células de un proceso de fermentación, y/o que es renovable, por ejemplo material derivado de organismos vivos o sus subproductos metabólicos incluyendo material derivado de biomasa, que consiste a menudo en componentes infrautilizados como paja o forraje. Por ejemplo, el uno o más materiales de partida de carbono pueden comprender una fuente de carbono seleccionada del grupo que consiste en glucosa, levoglucosano, sacarosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa, arabinosa, y mezclas de los mismos. Además por ejemplo, el uno o más materiales de partida de carbono pueden comprender uno o más de melaza, almidón, un ácido graso, un aceite vegetal, un material lignocelulósico, etanol, ácido acético, glicerol, un gas de síntesis derivado de biomasa y metano que se origina a partir de un gas de vertedero.

20 Considerando el uno o más materiales de partida de carbono adicionales, en algunas realizaciones, el uno o más materiales de partida de carbono pueden consistir esencialmente en una fuente de carbono seleccionada del grupo que consiste en glucosa, levoglucosano, sacarosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa, arabinosa, y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, el uno o más materiales de partida de carbono pueden consistir en una fuente de carbono seleccionada del grupo que consiste en glucosa, levoglucosano, sacarosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa, arabinosa, y mezclas de los mismos. Por tanto, en algunas realizaciones el uno o más materiales de partida de carbono pueden consistir esencialmente en una única fuente de carbono, por ejemplo glucosa. Además, en algunas realizaciones el uno o más materiales de partida de carbono pueden consistir en una única fuente de carbono, de nuevo por ejemplo glucosa.

30 El uno o más materiales de partida de carbono también pueden excluir compuestos particulares, tales como compuestos que son precursores inmediatos de 4-hidroxiacetil-CoA y/o compuestos que se fabrican normalmente a partir de recursos no renovables, por ejemplo de petróleo, basándose en un coste sustancialmente menor en comparación con la fabricación de los mismos a partir de recursos renovables, por ejemplo cultivos. La incorporación de tales compuestos para la producción de moléculas de copolímero de polihidroxiacanoato puede ser costosa, particularmente con respecto a la escala de fabricación industrial, por ejemplo mediante fermentación usando recipientes de 20.000 a 100.000 l, basándose en el requisito de alimentaciones adicionales y, por tanto, infraestructura y control de calidad, y puede dar como resultado la necesidad de un control más estricto con el fin de lograr composiciones de copolímero de polihidroxiacanoato con consistencia estructural. El uno o más materiales de partida de carbono pueden ser, por ejemplo, unos que no comprenden γ -butirolactona, 1,4-butanodiol, 4-hidroxiacetil-CoA, 3-hidroxiacetil-CoA, α -cetoglutarato, oxaloacetato, malato, fumarato, citrato, succinato o 3-hidroxiacetil-CoA, y por tanto que excluyen cada uno de estos compuestos. Por tanto, por ejemplo, el cultivo del organismo puede llevarse a cabo en ausencia de γ -butirolactona, 1,4-butanodiol, 4-hidroxiacetil-CoA, 3-hidroxiacetil-CoA, α -cetoglutarato, oxaloacetato, malato, fumarato, citrato, succinato y 3-hidroxiacetil-CoA, es decir, sin añadir ninguno de estos compuestos de manera exógena antes, durante o después del cultivo.

45 Las condiciones pueden ser condiciones que son adecuadas, por ejemplo típicas y/u óptimas, para el cultivo del organismo, por ejemplo con respecto a temperatura, oxigenación, título inicial del organismo, tiempo de cultivo, etc. Se proporcionan condiciones adecuadas a modo de ejemplo en los ejemplos a continuación.

50 El uno o más materiales de partida de carbono pueden convertirse en 3-hidroxiacetil-CoA y 4-hidroxiacetil-CoA mediante enzimas expresadas por el organismo, tal como se comenta en detalle en los ejemplos. La 3-hidroxiacetil-CoA y la 4-hidroxiacetil-CoA también pueden polimerizarse para formar las moléculas de copolímero de polihidroxiacanoato, formando de ese modo la composición, mediante enzimas expresadas por el organismo, de nuevo tal como se comenta en detalle en los ejemplos.

55 Según el método, el organismo se ha modificado por ingeniería genética mediante la incorporación estable de genes que codifican para una polihidroxiacanoato sintasa, una acetil-CoA acetiltransferasa, una acetoacetil-CoA reductasa, una succinato-semialdehído deshidrogenasa, una semialdehído succínico reductasa y una CoA transferasa, y para no comprender actividades enzimáticas de o bien una succinato-semialdehído deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ o bien una succinato-semialdehído deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ o ambas.

65 El organismo puede modificarse por ingeniería genética para comprender estas actividades enzimáticas transformando el organismo con uno o más genes que codifican para cada una de las actividades enzimáticas. Los genes se incorporan de manera estable en el organismo, por ejemplo mediante la introducción en uno o más plásmidos estables y/o mediante la integración en el genoma del organismo. El organismo también puede modificarse por ingeniería genética para comprender las actividades enzimáticas, por ejemplo, alterando las

regiones promotoras de uno o más genes que codifican para cada una de las actividades enzimáticas, por ejemplo, reemplazando los promotores que se producen de manera natural con promotores más fuertes y/o eliminando las secuencias represoras. Además, pueden usarse combinaciones de estos enfoques y similares. Usar enfoques tales como éstos puede dar como resultado la integración de los genes en el organismo con alta estabilidad, por ejemplo mayor que 50 generaciones del organismo, y alta expresión, suficiente para producción industrial, por ejemplo, mediante la fermentación usando recipientes de 20.000 a 100.000 l. Se comentan enfoques a modo de ejemplo adecuados en más detalle a continuación.

El organismo se modifica por ingeniería genética adicionalmente para no comprender actividades enzimáticas de o bien una succinato-semialdehído deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ o bien una succinato-semialdehído deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ o ambas, por ejemplo, introduciendo una o más mutaciones o secuencias inhibitoras en el organismo para inhibir la expresión de cualquiera o ambas actividades, delecionando del genoma del organismo los genes correspondientes que codifican para cualquiera o ambas actividades, alterando cualquiera o ambos de los genes correspondientes parcial o completamente mediante recombinación homóloga, y/o interfiriendo con la expresión de cualquiera o ambos de los genes correspondientes tal como expresando ARNip que interfiere con la expresión de los genes correspondientes. Se comentan enfoques a modo de ejemplo adecuados en más detalle a continuación.

Según el método, el organismo puede modificarse por ingeniería genética adicionalmente para comprender actividades enzimáticas de una alfa-cetoglutarato descarboxilasa o 2-oxoglutarato descarboxilasa, y una L-1,2-propanodiol oxidorreductasa. El organismo también puede modificarse por ingeniería genética para no comprender actividades enzimáticas de una o más de una tioesterasa II, una acil-CoA tioesterasa I y proteasa I y lisofosfolipasa L multifuncionales, una acil-CoA tioesterasa y una aldehído deshidrogenasa.

Además según el método, el uno o más materiales de partida de carbono, tomados juntos, tienen un contenido de base biológica de $\geq 80\%$. Mediante esto quiere decirse que la cantidad de carbono de base biológica en el uno o más materiales de partida de carbono, tomados juntos, es $\geq 80\%$ del peso (masa) del carbono orgánico total del uno o más materiales de partida de carbono, tomados juntos, tal como se mide según la norma ASTM D6866-12. Esto puede lograrse, por ejemplo, incluyendo al menos un material de partida de carbono correspondiente a un recurso renovable, por ejemplo glucosa, levoglucosano, sacarosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa, arabinosa, y mezclas de los mismos, de modo que el contenido de base biológica del recurso renovable es del 100% y que $\geq 80\%$ del peso (masa) del carbono orgánico total del uno o más materiales de partida de carbono se corresponde con el recurso renovable. El uno o más materiales de partida de carbono, tomados juntos, pueden tener, por ejemplo, un contenido de base biológica de $\geq 95\%$, $\geq 99\%$ o del 100%.

El método también puede comprender aislar las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato del organismo, de modo que la composición de copolímero de polihidroxicanoato está sustancialmente libre del organismo. En la técnica se conocen enfoques a modo de ejemplo adecuados para tal aislamiento.

Una composición de copolímero de polihidroxicanoato elaborada según los métodos descritos anteriormente también se da a conocer en el presente documento, pero no es parte del objeto reivindicado. La composición de copolímero de polihidroxicanoato comprende una pluralidad de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato, en la que las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato (i) comprenden monómeros de 3-hidroxibutirato y monómeros de 4-hidroxibutirato, (ii) tienen un porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxibutirato del 23,5 al 75%, (iii) tienen un contenido de base biológica de $\geq 80\%$, (iv) tienen un peso molecular promedio en peso de 250 kDa a 2,0 MDa, y además en la que la composición tiene una temperatura de transición vítrea de -60°C a -5°C . Además, la composición de polihidroxicanoato puede ser una, por ejemplo, en la que (a) el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxibutirato de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato es del 25 al 70%, del 30 al 40%, del 40 al 50%, del 50 al 60% o del 60 al 70%, (b) el contenido de base biológica de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato es $\geq 95\%$, $\geq 99\%$ o del 100%, (c) las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato tienen un peso molecular promedio en peso de 1,5 MDa a 2,0 MDa, o de 1,7 MDa a 2,0 MDa, (d) la composición tiene una temperatura de transición vítrea de -50°C a -15°C , de -50°C a -20°C , o de -45°C a -15°C , (e) el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxibutirato de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato no disminuye con el peso molecular creciente de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato.

Ejemplos

La presente tecnología se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que describen varias herramientas de biotecnología y métodos para la construcción de cepas que generan un producto de interés. Se describen cepas huésped adecuadas, la fuente potencial y una lista de genes recombinantes usados en estos ejemplos, vectores extracromosómicos adecuados, estrategias adecuadas y elementos reguladores para controlar la expresión génica recombinante, y una selección de técnicas de construcción para sobreexpresar genes en o inactivar genes de organismos huésped. Estas herramientas de biotecnología y métodos los conocen bien los expertos en la técnica.

Cepas huésped adecuadas

En algunas realizaciones, la cepa huésped es la cepa K-12 de *E. coli* LS5218 (Spratt *et al.*, J. Bacteriol. 146 (3):1166-1169 (1981); Jenkins y Nunn, J. Bacteriol. 169 (1):42-52 (1987)) o la cepa MG1655 (Guyer *et al.*, Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 45:135-140 (1981)). Otras cepas huésped K-12 de *E. coli* incluyen, pero no se limitan a, WG1 y W3110 (Bachmann Bacteriol. Rev. 36(4):525-57 (1972)). Alternativamente, la cepa W de *E. coli* (Archer *et al.*, BMC Genomics 2011, 12:9 doi:10.1186/1471-2164-12-9) o la cepa B de *E. coli* (Delbruck y Luria, Arch. Biochem. 1:111-141 (1946)) y sus derivados tales como REL606 (Lenski *et al.*, Am. Nat. 138:1315-1341 (1991)) son otras cepas huésped *E. coli* adecuadas.

Otras cepas huésped microbianas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: *Ralstonia eutropha*, *Zoogloea ramigera*, *Allochrocatium vinosum*, *Rhodococcus ruber*, *Delftia acidovorans*, *Aeromonas caviae*, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Tiocapsa pfenigii*, *Bacillus megaterium*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter bailyi*, *Clostridium kluveri*, *Metilobacterium extorquens*, *Nocardia corralina*, *Nocardia salmonicolor*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas* sp. 6-19, *Pseudomonas* sp. 61-3 y *Pseudomonas putida*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Alcaligenes latus*, *Klebsiella oxitoca*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Rhizobium etli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Gluconobacter oxidans*, *Zymomonas mobilis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptomyces coelicolor* y *Clostridium acetobutyllicum*. Las levaduras o los hongos a modo de ejemplo incluyen especies seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* y *Pichia pastoris*.

Las cepas de algas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: cepas de *Chlorella*, especies seleccionadas de: *Chlorella minutissima*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella* sp. o *Chlorella protothecoides*.

Fuente de genes recombinantes

Las fuentes de ácidos nucleicos codificantes para una enzima de la ruta de PHB-co-4HB pueden incluir, por ejemplo, cualquier especie en la que el producto génico codificado pueda catalizar la reacción de referencia. Tales especies incluyen tanto organismos procariontes como eucariotes incluyendo, pero sin limitarse a, bacterias, incluyendo arqueas y eubacterias, y eucariotes, incluyendo levadura, planta, insecto, animal y mamífero, incluyendo ser humano. Las especies a modo de ejemplo para tales fuentes incluyen, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluveri*, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Chlorogleopsis* sp. PCC 6912, *Chloroflexus aurantiacus*, *Clostridium kluveri*, *Clostridium acetobutyllicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium tetanomorphum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium aminobutyricum*, *Clostridium subterminale*, *Clostridium sticklandii*, *Ralstonia eutropha*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Arabidopsis thaliana*, *Thermus thermophilus*, especies de *Pseudomonas*, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella* sp., *Chlorella protothecoides*, *Homo sapiens*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Thermoanaerobacter brockii*, *Metallosphaera sedula*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Roseiflexus castenholzii*, *Erythrobacter*, *Simmondsia chinensis*, especies de *Acinetobacter*, incluyendo *Acinetobacter calcoaceticus* y *Acinetobacter bailyi*, *Sulfolobus tokodaii*, *Sulfolobus solfataricus*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus brevis*, *Bacillus pumilus*, *Rattus norvegicus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxitoca*, *Euglena gracilis*, *Treponema denticola*, *Moorella thermoacetica*, *Thermotoga maritima*, *Halobacterium salinarum*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Aeropyrum pernix*, *Sus scrofa*, *Caenorhabditis elegans*, *Corynebacterium glutamicum*, *Acidaminococcus fermentans*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterobacter aerogenes*, *Candida* sp., *Aspergillus terreus*, *Pedicoccus pentosaceus*, *Zymomonas mobilis*, *Acetobacter pasteurians*, *Kluyveromyces lactis*, *Eubacterium barkeri*, *Bacteroides capillosus*, *Anaerotruncus colihominis*, *Natranaerobius thermophilus*, *Campilobacter jejuni*, *Haemophilus influenzae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter amalonaticus*, *Myxococcus xanthus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Penicillium chrysogenum*, proteobacteria marina gamma y bacteria productora de butirato. Por ejemplo, los huéspedes microbianos (por ejemplo, organismos) que tienen producción biosintética de PHB-co-4HB se proporcionan a modo de ejemplo en el presente documento con referencia a un huésped de *E. coli*. Sin embargo, con la secuencia genómica completa disponible actualmente para más de 550 especies (con más de la mitad de éstas disponibles en bases de datos públicas tales como el NCBI), incluyendo genomas de 395 microorganismos y una variedad de genomas de levaduras, hongos, plantas y mamíferos, la identificación de genes que codifican para la actividad biosintética de PHB-co-4HB requerida para uno o más genes en especies relacionadas o distantes, incluyendo por ejemplo, desplazamientos de genes homólogos, ortólogos, parálogos y no ortólogos de genes conocidos, y el intercambio de alteraciones genéticas entre organismos, es rutina y se conoce bien en la técnica. Por consiguiente, las alteraciones metabólicas que permiten la biosíntesis de PHB-co-4HB y otros compuestos de la divulgación en el presente documento con referencia a un organismo particular tal como *E. coli* pueden aplicarse fácilmente a otros microorganismos, incluyendo organismos procariontes y eucariotes similares. Dadas las enseñanzas y la guía proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica sabrán que una alteración metabólica a modo

de ejemplo en un organismo puede aplicarse igualmente a otros organismos.

Producción de huésped transgénico para producir 4HB

5 Se modifican por ingeniería genética huéspedes transgénicos (recombinantes) para producir PHB-co-4HB usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Los genes clonados y/o evaluados para las cepas huésped que producen PHB-co-4HB se presentan a continuación en la tabla 1A, junto con las referencias y el número de comisión de enzima (número EC) apropiado. Algunos genes se sintetizaron para la optimización de codones mientras que otros se clonaron mediante PCR a partir del ADN genómico del huésped nativo o de tipo natural. Tal como se usa en el presente documento, "heterólogo" significa de otro huésped. El huésped puede ser de la misma o de diferente especie. La figura 1 es una ruta a modo de ejemplo para producir PHB-co-4HB.

15 Tabla 1A. Genes sobreproducidos o delecionados en cepas huésped microbianas que producen PHB-co-4HB según la figura 1. Un asterisco (*) después del nombre del gen indica que la secuencia de nucleótidos se optimizó para la expresión en *E. coli*.

Número de reacción (Fig. 1)	Nombre del gen	Nombre de la enzima	Número EC	N.º de registro o referencia
1	<i>phaA5</i>	Acetil-CoA acetiltransferasa (también conocida como beta-cetotiolasa)	2.3.1.9	2VU2_A
2	<i>phaB5</i>	Acetoacetil-CoA reductasa	1.1.1.36	P23238
3	<i>sucD*</i>	Succinato-semialdehído deshidrogenasa	1.2.1.76	ID de gen/proteína 1; solicitud de patente estadounidense n.º 2011/024612
4	<i>kgdM</i>	Alfa-cetoglutarato descarboxilasa	4.1.1.71	NP_335730
4	<i>kgdP</i>	Alfa-cetoglutarato descarboxilasa	4.1.1.n	YP_004335105
4	<i>kgdS</i>	2-Oxoglutarato descarboxilasa	4.1.1.n	ACB00744.1
5	<i>ssaRA*</i>	Semialdehído succínico reductasa	1.1.1.61	ID de gen/proteína 2; solicitud de patente estadounidense n.º 2011/024612
5	<i>fucO_{16L-L7V}</i>	L-1,2-propanodiol oxidoreductasa	1.1.1.77	ID de gen/proteína 3
6	<i>orfZ</i>	CoA transferasa	2.8.3.n	AAA92344
6	<i>orfZ150</i>	CoA transferasa	2.8.3.n	NP_904965
7	<i>buk1</i>	Butirato cinasa I	2.7.2.7	NP_349675
7	<i>buk2</i>	Butirato cinasa II	2.7.2.7	NP_348286
8	<i>ptb</i>	Fosfotransbutirilasa	2.3.1.19	NP_349676
9	<i>phaC3/C5</i>	Proteína de fusión de polihidroxialcanoato sintasa	2.3.1.n	ID de gen/proteína 4; patente estadounidense n.º 6.316.262; solicitud de patente estadounidense n.º 20100168481 A1
9	<i>phaC3/C1*</i>	Proteína de fusión de polihidroxialcanoato sintasa	2.3.1.n	ID de gen/proteína 5; solicitud de patente estadounidense n.º 2011/024612
9	<i>phaC3/C33</i>	Proteína de fusión de polihidroxialcanoato sintasa	2.3.1.n	ID de gen/proteína 6
10	<i>ynel</i>	Succinato-semialdehído deshidrogenasa, dependiente de NAD ⁺	1.2.1.24	NP_416042
10	<i>gabD</i>	Succinato-semialdehído	1.2.1.16	NP_417147

		deshidrogenasa, dependiente de NADP+		
10	<i>astD</i>	Aldehído deshidrogenasa	1.2.1.71	NP_416260
11	<i>ppCEC</i>	Fosfoenolpiruvato carboxilasa	4.1.1.31	NP_418391
12	<i>tesA</i>	Acil-CoA tioesterasa I y proteasa I y lisofosfolipasa L1 multifuncionales	3.1.1.5, 3.1.2.14	NP_415027
12	<i>tesB</i>	Tioesterasa II	3.1.2.20	ZP_08342109
12	<i>yciA</i>	Acil-CoA tioesterasa	3.1.2.20	NP_415769

5 Pueden descubrirse otras proteínas que pueden catalizar las reacciones enumeradas en la tabla 1A consultando la bibliografía científica, las patentes, las búsquedas BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.info/>) y/o las búsquedas BLAST frente a, por ejemplo, las bases de datos de nucleótidos o proteínas en el NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Los genes sintéticos pueden crearse para proporcionar una ruta fácil desde las bases de datos de secuencias hasta el ADN físico. Tales genes sintéticos están diseñados y fabricados desde cero, usando codones para mejorar la expresión de proteínas heterólogas y optimizando las características necesarias para el sistema de expresión y el huésped. Empresas tales como, por ejemplo, DNA 2.0 (Menlo Park, CA 94025, EE.UU.) proporcionarán tal servicio de rutina. Las proteínas que pueden catalizar algunas de las reacciones bioquímicas enumeradas en la tabla 1A se proporcionan en las tablas 1B a 1X.

10 Tabla 1B. Homólogos adecuados para la proteína PhaA5 (beta-cetotiolasa, de *Zoogloea ramigera*, n.º EC 2.3.1.9, que actúa sobre acetil-CoA + acetil-CoA para producir acetoacetil-CoA; n.º de registro de proteína 2VU2_A).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
acetil-CoA acetiltransferasa	YP_002827756
acetil-CoA acetiltransferasa	YP_002283310
acetil-CoA acetiltransferasa	YP_002733453
acetil-CoA acetiltransferasa	ZP_01011874
acetil-CoA acetiltransferasa	ZP_00961105
acetil-CoA acetiltransferasa	YP_426557
acetil-coenzima A acetiltransferasa 3	NP_694791
acetil-CoA acetiltransferasa	YP_003153095
acetil-CoA acetiltransferasa	CCF95917
acetil-CoA acetiltransferasa	ZP_07454459

15 Tabla 1C. Homólogos adecuados para la proteína PhaB5 (acetoacetil-CoA reductasa, de *Zoogloea ramigera*, n.º EC 1.1.1.36, que actúa sobre la acetoacetil-CoA para producir 3-hidroxiacetil-CoA; n.º de registro de proteína P23238).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
acetoacetil-CoA reductasa	YP_002827755
producto del gen phaB	YP_770184
acetoacetil-CoA reductasa	ZP_08627619
Molibdopterina-guanina dinucleótido proteína de biosíntesis A	ZP_01901796
acetoacetil-CoA reductasa	YP_006369576
Supuesto Phab de acetoacetil-CoA reductasa	ZP_09394630
acetoacetil-CoA reductasa	YP_001352246
acetoacetil-CoA reductasa	ZP_02467262
acetoacetil-CoA reductasa	ZP_01985557

20 Tabla 1D. Homólogos adecuados para la proteína SucD (succinato-semialdehído deshidrogenasa, de *Clostridium kluyveri*, n.º EC 1.2.1.76, que actúa sobre succinil-CoA para producir succinato-semialdehído; n.º de registro de

proteína YP_001396394).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
succinato-semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoAsa	AAA92347
succinato-semialdehído deshidrogenasa [NAD(P)+]	ZP_06559980
succinato-semialdehído deshidrogenasa [NAD(P)+]	ZP_05401724
proteína de la familia de aldehído-alcohol deshidrogenasa	ZP_07821123
succinato-semialdehído deshidrogenasa [NAD(P)+]	ZP_06983179
succinato-semialdehído deshidrogenasa	YP_001928839
proteína hipotética CLOHYLEM_05349	ZP_03778292
succinato-semialdehído deshidrogenasa [NAD(P)+]	YP_003994018
succinato-semialdehído deshidrogenasa	NP_904963

5 Tabla 1E. Homólogos adecuados para la proteína KgdM (alfa-cetoglutarato descarboxilasa, de *Tuberculosis micobacteriana*, n.º EC 4.1.1.71, que actúa sobre el alfa-cetoglutarato para producir succinato-semialdehído y dióxido de carbono; n.º de registro de proteína NP_335730).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	YP_001282558
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	NP_854934
2-oxoglutarato deshidrogenasa sucA	ZP_06454135
2-oxoglutarato deshidrogenasa sucA	ZP_04980193
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	NP_961470
alfa-cetoglutarato descarboxilasa Kgd	YP_001852457
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	NP_301802
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	ZP_05215780
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	YP_001702133

10 Tabla 1F. Homólogos adecuados para la proteína KgdP (alfa-cetoglutarato descarboxilasa, de *Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190, n.º EC 4.1.1.n, que actúa sobre el alfa-cetoglutarato para producir succinato-semialdehído y dióxido de carbono; n.º de registro de proteína YP_004335105).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	ZP_08119245
2-oxoglutarato deshidrogenasa, componente E1	ZP_09743222
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	YP_705947
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	NP_961470
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	ZP_08024348
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	YP_003343675
producto del gen kgd	NP_737800
complejo de 2-oxoglutarato deshidrogenasa, YP_004223349 componente (E1) de deshidrogenasa	
oxoglutarato deshidrogenasa (transferencia de E1) succinilo), componente E1	EJF35718

15 Tabla 1G. Homólogos adecuados para la proteína KgdS (2-oxoglutarato descarboxilasa, de *Synechococcus sp.* PCC 7002, n.º EC 4.1.1.n, que actúa sobre el alfa-cetoglutarato para producir succinato-semialdehído y dióxido de carbono; n.º de registro de proteína ACB00744.1).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	YP_001282558
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	NP_854934
2-oxoglutarato deshidrogenasa sucA	ZP_06454135
2-oxoglutarato deshidrogenasa sucA	ZP_04980193
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	NP_961470
alfa-cetoglutarato descarboxilasa Kgd	YP_001852457
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	NP_301802
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	ZP_05215780
alfa-cetoglutarato descarboxilasa	YP_001702133

5 Tabla 1H. Homólogos adecuados para la proteína SsaR_{At} (semialdehído succínico reductasa, de *Arabidopsis thaliana*, n.º EC 1.1.1.61, que actúa sobre el succinato-semialdehído para producir 4-hidroxiacetato; n.º de registro de proteína AAK94781).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
proteína que contiene el dominio de unión a NAD de 6-fosfogluconato deshidrogenasa	XP_002885728
isoforma de proteína hipotética 1	XP_002266252
proteína prevista	XP_002320548
isoforma de proteína hipotética 2	XP_002266296
desconocido	ACU22717
3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, supuesta	XP_002524571
desconocida	ABK22179
desconocida	ACJ85049
proteína prevista	XP_001784857

10 Tabla 1I. Homólogos adecuados para la proteína FucO_{16L-17V} (L-1,2-propanodiol oxidorreductasa, de *Escherichia coli* cepa K-12 subcepa MG1655, n.º EC 1.1.1.77, que actúa sobre el succinato-semialdehído para producir 4-hidroxiacetato).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
L-1,2-propanodiol oxidorreductasa	YP_001459571
lactaldehído reductasa	ZP_12475782
L-1,2-propanodiol oxidorreductasa	YP_001455658
lactaldehído reductasa	ZP_17109585
L-1,2-propanodiol oxidorreductasa	YP_003294352
L-1,2-propanodiol oxidorreductasa	YP_002988900
L-1,2-propanodiol oxidorreductasa	ZP_09185179
lactaldehído reductasa	ZP_06759418
alcohol deshidrogenasa	ZP_05943499

15 Tabla 1J. Homólogos adecuados para la proteína OrfZ (CoA transferasa, de *Clostridium kluyveri* DSM 555, n.º EC 2.8.3.n, que actúa sobre 4-hidroxiacetato para producir 4-hidroxiacetil CoA; n.º de registro de proteína AAA92344).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
4-hidroxiacetato coenzima A transferasa	YP_001396397

acetil-CoA hidrolasa/transferasa	ZP_05395303
acetil-CoA hidrolasa/transferasa	YP_001309226
4-hidroxibutirato coenzima A transferasa	NP_781174
4-hidroxibutirato coenzima A transferasa	ZP_05618453
acetil-CoA hidrolasa/transferasa	ZP_05634318
4-hidroxibutirato coenzima A transferasa	ZP_00144049
proteína hipotética ANASTE_01215	ZP_02862002
4-hidroxibutirato coenzima A transferasa	ZP_07455129

5 Tabla 1K. Homólogos adecuados para la proteína OrfZ150 (CoA transferasa, de *Porphyromonas gingivalis* W83, n.º EC 2.8.3.n, que actúa sobre 4-hidroxibutirato para producir 4-hidroxibutiril CoA; n.º de registro de proteína NP_904965).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
4-hidroxibutirato CoA-transferasa	YP_005014371
proteína hipotética FUAG_02467	ZP_10973595
acetil-CoA hidrolasa/transferasa	ZP_10325539
4-hidroxibutirato coenzima A transferasa	ZP_10895308
4-hidroxibutirato CoA-transferasa	ZP_15973607
acetil-CoA hidrolasa/transferasa	YP_003639307
4-hidroxibutirato coenzima A transferasa	ZP_08514074
succinil:benzoato coenzima A transferasa	YP_006721017
4-hidroxibutirato CoA-transferasa	YP_003961374

10 Tabla 1L. Homólogos adecuados para la proteína Buk1 (butirato cinasa I, de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824, n.º EC 2.7.2.7, que actúa sobre 4-hidroxibutirato para producir fosfato de 4-hidroxibutirilo).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
butirato cinasa	YP_001788766
butirato cinasa	YP_697036
butirato cinasa	YP_003477715
butirato cinasa	YP_079736
acetato y butirato cinasa	ZP_01667571
butirato cinasa	YP_013985
butirato cinasa	ZP_04670620
butirato cinasa	ZP_04670188
butirato cinasa	ZP_07547119

15 Tabla 1M. Homólogos adecuados para la proteína Buk2 (butirato cinasa II, de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824, n.º EC 2.7.2.7, que actúa sobre 4-hidroxibutirato para producir fosfato de 4-hidroxibutirilo).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
butirato cinasa	YP_001311072
proteína hipotética CLOSPO_00144	ZP_02993103
proteína hipotética COPEUT_01429	ZP_02206646
butirato cinasa	EFR5649
butirato cinasa	ZP_0720132

ES 2 747 230 T3

butirato cinasa	YP_0029418
butirato cinasa	YP_002132418
butirato cinasa	ZP_05389806
fosfato butiriltransferasa	ADQ27386

- 5 Tabla 1N. Homólogos adecuados para la proteína Ptb (fosfotransbutirilasa, de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824, n.º EC 2.3.1.19, que actúa sobre el fosfato de 4-hidroxibutirilo para producir 4-hidroxibutiril CoA).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
fosfato butiriltransferasa	YP_001884531
proteína hipotética COPCOM_01477	ZP_03799220
fosfato butiriltransferasa	YP_00331697
fosfato butiriltransferasa	YP_004204177
fosfato acetil/butiriltransferasa	ZP_05265675
supuesta fosfato acetil/butiriltransferasa	ZP_05283680
enoil-CoA hidratasa/fosfato acetiltransferasa bifuncional	YP_426556
proteína hipotética CLOBOL_07039	ZP_02089466
fosfato butiriltransferasa	YP_003564887

- 10 Tabla 1O. Homólogos adecuados para la proteína PhaC3/C5 (proteína de fusión de polihidroxialcanoato sintasa de *Pseudomonas putida* y *Zoogloea ramigera*, n.º CE 2.3.1.n, que actúa sobre (R)-3-hidroxibutiril-CoA o 4-hidroxibutiril-CoA + [(R)-3-hidroxibutanoato-co-4-hidroxibutanoato]_n para producir [(R)-3-hidroxibutanoato-co-4-hidroxibutanoato]_n + CoA y también actúa sobre 4-hidroxibutiril-CoA + [4-hidroxibutanoato]_n para producir [4-hidroxibutanoato]_(n+1) + CoA).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
PHB polimerasa	AAB06755
ácido polihidroxialcanoico sintasa	ZP_10443466
poli(R)-ácido hidroxialcanoico sintasa, clase I	ZP_10719804
poli(3-hidroxibutirato) polimerasa PhaC	YP_004685292
poli(R)-ácido hidroxialcanoico sintasa, clase I	ZP_02382303
poli-beta-hidroxibutirato polimerasa	YP_003977718
producto del gen phaC2	YP_583821
poli(R)-ácido hidroxialcanoico sintasa	YP_001003639
poli(R)-ácido hidroxialcanoico sintasa	YP_283333

- 15 Tabla 1P. Homólogos adecuados para la proteína PhaC3/C1 (proteína de fusión de polihidroxialcanoato sintasa de *Pseudomonas putida* y *Ralstonia eutropha* JMP134, n.º EC 2.3.1.n, que actúa sobre (R)-3-hidroxibutiril-CoA o 4-hidroxibutiril-CoA + [(R)-3-hidroxibutanoato-co-4-hidroxibutanoato]_n para producir [(R)-3-hidroxibutanoato-co-4-hidroxibutanoato]_(n+1) + CoA y también actúa sobre 4-hidroxibutiril-CoA + [4-hidroxibutanoato]_n para producir [4-hidroxibutanoato]_(n+1) + CoA).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
poli(R)-ácido hidroxialcanoico sintasa, clase I	YP_295561
poli(3-hidroxibutirato) polimerasa	YP_725940
ácido polihidroxialcanoico sintasa	AAW65074
ácido polihidroxialcanoico sintasa	YP_002005374
poli(R)-ácido hidroxialcanoico sintasa, clase I	YP_583508
polihidroxialcanoato sintasa intracelular	ADM24646

poli(3-hidroxialcanoato) polimerasa	ZP_00942942
ácido polihidroxialcanoico sintasa	YP_003752369
PhaC	AAF23364

- 5 Tabla 1Q. Homólogos adecuados para la proteína PhaC3/C33 (proteína de fusión de polihidroxialcanoato sintasa de *Pseudomonas putida* y *Delftia acidovorans* 89-11-102, n.º EC 2.3.1.n, que actúa sobre (R)-3-hidroxi-butiril-CoA o 4-hidroxi-butiril-CoA + [(R)-3-hidroxi-butanoato-co-4-hidroxi-butanoato]_n para producir [(R)-3-hidroxi-butanoato-co-4-hidroxi-butanoato]_(n+1) + CoA y también actúa sobre 4-hidroxi-butiril-CoA + [4-hidroxi-butanoato]_n para producir [4-hidroxi-butanoato]_(n+1) + CoA).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
polihidroxi-butirato sintasa	AAL17611
poli(R)-ácido hidroxialcanoico sintasa, clase I	ZP_04764634
proteína de poli-beta-hidroxi-butirato polimerasa	CAQ36337
poli-beta-hidroxi-butirato polimerasa	YP_004360851
poli(R)-ácido hidroxialcanoico sintasa, clase I	ZP_08961344
poli(R)-ácido hidroxialcanoico sintasa	YP_983028
ácido polihidroxialcanoico sintasa	EGF41868
poli-beta-hidroxi-butirato polimerasa	ZP_02489627
polihidroxialcanoato sintasa	ABN71571

- 10 Tabla 1R. Homólogos adecuados para la proteína Ynel (Sad) (succinato-semialdehído deshidrogenasa, dependiente de NAD⁺, de *Escherichia coli* cepa K-12 subcepa MG1655, n.º EC 1.2.1.24, que actúa sobre el semialdehído de glutarato (semialdehído succínico) para producir glutarato (succinato); n.º de registro de proteína NP_416042 (Führer *et al.* J Bacteriol. Noviembre de 2007; 189 (22): 8073-8. Dennis y Valentin, patente estadounidense n.º 6.117.658)).

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

- 15 Tabla 1S. Homólogos adecuados para la proteína GabD (succinato-semialdehído deshidrogenasa, dependiente de NADP⁺, de *Escherichia coli* cepa K-12 subcepa MG1655, n.º EC 1.2.1.20, que actúa sobre el semialdehído de glutarato (o semialdehído succínico) para producir glutarato (o succinato); n.º de registro de proteína NP_417147 (Riley *et al.* Nucleic Acids Res. 34 (1), 1-9 (2006))).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
succinato-semialdehído deshidrogenasa I	ZP_05433422
succinato-semialdehído deshidrogenasa (NAD(P)(+))	YP_001744810
proteína hipotética CIT292_04137	ZP_03838093
succinato-semialdehído deshidrogenasa	YP_002638371
succinato-semialdehído deshidrogenasa I	YP_001333939

succinato-semialdehído deshidrogenasa I	NP_ 742381
succinato-semialdehído deshidrogenasa [NADP+] (ssdh)	YP_002932123
semialdehído succínico deshidrogenasa	YP_ 001951927
succinato-semialdehído deshidrogenasa	YP_ 298405

5 Tabla 1T. Homólogos adecuados para la proteína AstD (aldehído deshidrogenasa de *Escherichia coli* cepa K-12 subcepa MG1655, n.º EC 1.2.1.71, que actúa sobre el succinato-semialdehído para producir succinato); n.º de registro de proteína NP_416260.

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
semialdehído succinilglutámico deshidrogenasa	YP_002382476
proteína hipotética D186_18882	ZP_16280274
semialdehído succinilglutámico deshidrogenasa	YP_003942089
succinilglutamato-semialdehído deshidrogenasa	ZP_16225314
semialdehído succinilglutámico deshidrogenasa AstD	YP_005933902
semialdehído succinilglutámico deshidrogenasa	YP_005431041
semialdehído succinilglutámico deshidrogenasa	ZP_10352779
semialdehído succinilglutámico deshidrogenasa	ZP_10036944
semialdehído succinilglutámico deshidrogenasa	YP_004730031

10 Tabla 1U. Homólogos adecuados para la proteína Ppc (fosfoenolpiruvato carboxilasa, de *Escherichia coli* cepa K-12 subcepa MG1655, n.º EC 4.1.1.31, que actúa sobre fosfoenolpiruvato y dióxido de carbono para producir oxaloacetato; n.º de registro de proteína NP_418391).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
fosfoenolpiruvato carboxilasa	ZP_02904134
fosfoenolpiruvato carboxilasa	YP_002384844
fosfoenolpiruvato carboxilasa	YP_003367228
fosfoenolpiruvato carboxilasa	ZP_02345134
fosfoenolpiruvato carboxilasa	ZP_04558550
fosfoenolpiruvato carboxilasa	YP_003615503
fosfoenolpiruvato carboxilasa	YP_002241183
fosfoenolpiruvato carboxilasa	CBK84190
fosfoenolpiruvato carboxilasa	YP_003208553

15 Tabla 1V. Homólogos adecuados para la proteína TesA (acil-CoA tioesterasa I y proteasa I y lisofosfolipasa L1 multifuncionales, de *Escherichia coli* cepa K-12 subcepa MG1655, n.º EC 3.1.1.5 y 3.1.2.14, que actúa sobre 4-hidroxi-butiril-CoA para producir 4-hidroxi-butirato; n.º de registro de proteína NP_415027).

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
acil-CoA tioesterasa I/proteasa I/lisofosfolipasa L1 multifuncionales	ZP_16276771
acil-CoA tioesterasa I/proteasa I/lisofosfolipasa L1 multifuncionales	YP_001175703
tesA; acil-CoA tioesterasa I	ZP_06549555
precursor de arilesterasa	ZP_16338589
acil-CoA tioesterasa I/proteasa I/lisofosfolipasa L1 multifuncionales	YP_006343946
lisofosfolipasa	YP_002986681
acil-CoA tioesterasa I y proteasa I y lisofosfolipasa L1 multifuncionales	YP_049328
acil-CoA tioesterasa I y proteasa I y lisofosfolipasa L1 multifuncionales	ZP_10113091

proteína hipotética PROSTU 03568

ZP_02997848

Tabla 1W. Homólogos adecuados para la proteína TesB (tioesterasa II, de *Escherichia coli* cepa K-12 subcepa MG1655, n.º EC 3.1.2.20, que actúa sobre 4-hidroxibutiril-CoA para producir 4-hidroxibutirato; n.º de registro de proteína ZP_08342109).

5

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
acil-CoA tioesterasa II	ZP_09460164
acil-CoA tioesterasa	NP_455062
acil-CoA tioesterasa II	ZP_10490626
acil-CoA tioesterasa II TesB	YP_005196718
acil-CoA tioesterasa II	YP_002649594
acil-CoA tioesterasa II (TEII)	NP_931060
acil-CoA tioesterasa II	ZP_01217095
acil-CoA tioesterasa II	ZP_10142747
acil-CoA tioesterasa II	ZP_10354000

Tabla 1X. Homólogos adecuados para la proteína YciA (acil-CoA tioesterasa, de *Escherichia coli* cepa K-12 subcepa MG1655, n.º EC 3.1.2.20, que actúa sobre 4-hidroxibutiril-CoA para producir 4-hidroxibutirato; n.º de registro de proteína NP_415769).

10

Nombre de la proteína	N.º de registro de proteína
acil-CoA tioéster hidrolasa	YP_002382845
acil-CoA tioéster hidrolasa	YP_001570262
proteína de la superfamilia de tioesterasa	YP_005019613
acil-CoA tioéster hidrolasa	YP_050409
acil-CoA tioéster hidrolasa	YP_002151085
acil-CoA tioéster hidrolasa YciA	NP_777876
proteína hipotética VC1701	NP_231337
proteína de la superfamilia de tioesterasa	YP_002893359
acil-CoA tioéster hidrolasa	ZP_11128814

Vectores y plásmidos extracromosómicos adecuados

Un "vector", tal como se usa en el presente documento, es un replicón extracromosómico, tal como un plásmido, fago o cósmido, en el que puede insertarse otro segmento de ADN para lograr la replicación del segmento insertado. Los vectores varían en número de copias, dependiendo de su origen de replicación y tamaño. Los vectores con diferentes orígenes de replicación pueden propagarse en la misma célula microbiana a menos que estén estrechamente relacionados, tales como pMB1 y ColE1. Los vectores adecuados para expresar proteínas recombinantes pueden constituir vectores pUC con un origen de replicación pMB1 que tienen 500-700 copias por célula, vectores pBluescript con un origen de replicación ColE1 que tienen 300-500 copias por célula, pBR322 y derivados con un origen de replicación pMB1 que tienen 15-20 copias por célula, pACYC y derivados con un origen de replicación p15A que tienen 10-12 copias por célula, y pSC101 y derivados con un origen de replicación pSC101 que tienen aproximadamente 5 copias por célula tal como se describe en el manual de purificación de plásmidos QIAGEN® (encontrado en la red informática mundial en: [//kirshner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAGENPlasmidPurification_EN.pdf](http://kirshner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAGENPlasmidPurification_EN.pdf)). Un vector ampliamente utilizado es pSE380 que permite la expresión de genes recombinantes a partir de un promotor *trc* inducible por IPTG (Invitrogen, La Jolla, CA).

Estrategias adecuadas y secuencias de control de la expresión para expresión génica recombinante

Se han descrito ampliamente estrategias para lograr la expresión de genes recombinantes en *E. coli* en la bibliografía (Gross, *Química Oggi* 7(3):21-29 (1989); Olins y Lee, *Cur. Op. Biotech.* 4:520-525 (1993); Makrides, *Microbiol. Rev.* 60(3):512-538 (1996); Hannig y Makrides, *Trends in Biotech.* 16:54-60 (1998)). Las secuencias de

control de la expresión pueden incluir promotores constitutivos e inducibles, potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción y similares que se conocen bien en la técnica. Los promotores adecuados incluyen, pero no se limitan a, P_{lac} , P_{tac} , P_{trc} , P_R , P_L , P_{phoA} , P_{ara} , P_{uspA} , P_{rpsU} , P_{syn} (Rosenberg y Court, Ann. Rev. Genet. 13:319-353 (1979); Hawley y McClure, Nucl. Acids Res. 11 (8):2237-2255 (1983); Harley y Reynolds, Nucl. Acids Res. 15:2343-2361 (1987); también en la red informática mundial en ecocyc.org y partsregistry.org).

Los promotores a modo de ejemplo son: P_{synA} (5'-TTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGC -3') (SEQ ID NO: 1), P_{synC} (5'-TTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTACTGTGCTAGC -3') (SEQ ID NO: 2), P_{synE} (5'-TTTACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATTATGCTAGC -3') (SEQ ID NO: 3), P_{synH} (5'-CTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGC -3') (SEQ ID NO: 4), P_{synK} (5'-TTTACGGCTAGCTCAGTCCTAGGTACAATGCTAGC -3') (SEQ ID NO: 5), P_{synM} (5'-TTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGGACTATGCTAGC -3') (SEQ ID NO: 6), P_x (5'-TCGCCAGTCTGGCCTGAACATGATATAAAAT -3') (SEQ ID NO: 7), P_{uspA} (5'-AACCACTACAATATATTCATGTCGAAAATTTGTTTATCTAACGAGTAAGCAAGGCGGAT TGACGGATCATCCGGGTCGCTATAAGGTAAGGATGGTCTTAACACTGAATCCTTACGGCT GGGTTAGCCCCGCGCACGTAGTTCGCAGGACGCGGGTGACGTAACGGCACAAGAAACG-3') (SEQ ID NO: 8), P_{rpsU} (5'-ATGCGGGTTGATGTAAAACCTTTGTTCCGCCCTGGAGAAAGCCTCGTGTATACTCCTCACC CTTATAAAAGTCCCTTTCAAAAAAGGCCGCGGTGCTTTACAAAGCAGCAGCAATTGCAGT AAAATTCCGCACCATTTTTGAAATAAGCTGGCGTTGATGCCAGCGGCAAAC -3') (SEQ ID NO: 9), P_{synAF7} (5'-TTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTACAGTGCTAGC -3') (SEQ ID NO: 10), y P_{synAF3} (5'-TTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTACAATGCTAGC -3') (SEQ ID NO: 11).

Los terminadores a modo de ejemplo son: T_{trpL} (5'-CTAATGAGCGGGCTTTTTTTTTGAACAAA -3') (SEQ ID NO: 12), T_{1006} (5'-AAAAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGCCTTTCGTTTTAT -3') (SEQ ID NO: 13), T_{rrnB1} (5'-ATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGCCTTTCGTTTTAT -3') (SEQ ID NO: 14), y T_{rrnB2} (5'-AGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTT -3') (SEQ ID NO: 15).

Construcción de huéspedes recombinantes

Pueden construirse huéspedes recombinantes que contienen los genes necesarios que codificarán para la ruta enzimática para la conversión de un sustrato de carbono en PHB-co-4HB usando técnicas bien conocidas en la técnica.

Los métodos de obtención de los genes deseados a partir de un organismo fuente (huésped) son comunes y se conocen bien en la técnica de biología molecular. Tales métodos se describen en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001); Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999). Por ejemplo, si la secuencia del gen se conoce, el ADN puede amplificarse a partir de ADN genómico usando reacción en cadena de la polimerasa (Mullis, patente estadounidense n.º 4.683.202) con cebadores específicos para el gen de interés para obtener cantidades de ADN adecuadas para ligación en vectores apropiados. Alternativamente, el gen de interés puede sintetizarse químicamente *de novo* con el fin de tomar en consideración el sesgo de codón del organismo huésped para potenciar la expresión de proteína heteróloga. Pueden unirse secuencias de control de la expresión tales como promotores y terminadores de la transcripción a un gen de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores modificados por ingeniería genética que contienen tales secuencias. Otra forma es introducir el gen aislado en un vector que ya contiene las secuencias de control necesarias en el orden adecuado mediante ligación y digestión de endonucleasas de restricción. Un ejemplo de este último enfoque es la tecnología BioBrick™ (www.biobricks.org) en la que múltiples fragmentos de ADN pueden ensamblarse secuencialmente juntos de manera normalizada usando los dos mismos sitios de restricción.

Además de usar vectores, pueden introducirse genes que son necesarios para la conversión enzimática de un sustrato de carbono en PHB-co-4HB en un organismo huésped mediante la integración en el cromosoma usando o bien un enfoque dirigido o bien aleatorio. Para la integración dirigida en un sitio específico en el cromosoma, se usa el método generalmente conocido como modificación por ingeniería genética mediada por recombinación (*recombineering*) de Red/ET tal como describieron originalmente Datsenko y Wanner (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 6640-6645). La integración aleatoria en el cromosoma implica usar un enfoque mediado por un transposón mini-Tn5 tal como describen Huisman *et al.* (patentes estadounidenses n.ºs 6.316.262 y 6.593.116).

Cultivo de huésped para producir biomasa de PHB-co-4HB

En general, el huésped recombinante se cultiva en un medio con una fuente de carbono y otros nutrientes esenciales para producir la biomasa de PHB-co-4HB mediante técnicas de fermentación o bien discontinuas o bien usando métodos de funcionamiento continuo conocidos en la técnica. También pueden añadirse aditivos adicionales, por ejemplo agentes antiespumantes y similares, para lograr las condiciones de crecimiento deseadas. La fermentación es particularmente útil para la producción a gran escala. Un método a modo de ejemplo usa biorreactores para cultivar y procesar el caldo de fermentación hasta el producto deseado. Otras técnicas tales como técnicas de separación pueden combinarse con la fermentación para la producción a gran escala y/o continua.

Tal como se usa en el presente documento, el término “materia prima” se refiere a una sustancia usada como material de partida de carbono en un proceso industrial. Cuando se usa en referencia a un cultivo de organismos tales como organismos microbianos o de algas tales como un proceso de fermentación con células, el término se refiere al material de partida usado para proporcionar un carbono u otra fuente de energía para las células. Las fuentes de carbono útiles para la producción de PHB-co-4HB incluyen fuentes simples y económicas, por ejemplo, glucosa, levoglucosano, sacarosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa, arabinosa y similares, solos o en combinación. En otras realizaciones, la materia prima es melaza, almidón, un ácido graso, un aceite vegetal, un material lignocelulósico y similares, de nuevo solos o en combinación. En todavía otras realizaciones, la materia prima puede ser etanol, ácido acético, glicerol y similares, solos o en combinación. También es posible usar organismos para producir la biomasa de PHB-co-4HB que crecen en gas de síntesis (CO₂, CO e hidrógeno) producido a partir de recursos de biomasa renovables, es decir un gas de síntesis derivado de biomasa y/o metano que se origina a partir de un gas de vertedero.

La introducción de genes de la ruta de PHB-co-4HB permite flexibilidad en el uso de materias primas fácilmente disponibles y económicas. Una materia prima “renovable” se refiere a una fuente de energía renovable tal como un material derivado de organismos vivos o sus subproductos metabólicos incluyendo material derivado de biomasa, que consiste a menudo en componentes infrautilizados como paja o forraje. Los productos agrícolas cultivados específicamente para su uso como materias primas renovables incluyen, por ejemplo, maíz, habas de soja, pasto varilla y árboles tales como chopo, trigo, linaza y colza, azúcar de caña y aceite de palma. Como fuentes de energía y materiales de partida renovables, las materias primas agrícolas basadas en cultivos son el reemplazo definitivo para las reservas de petróleo en declive. Las plantas usan energía solar y la fijación de dióxido de carbono para elaborar miles de sustancias bioquímicas complejas y funcionales más allá de la capacidad actual de la química de síntesis moderna. Éstas incluyen sustancias químicas finas y a granel, sustancias farmacéuticas, productos nutracéuticos, flavonoides, vitaminas, perfumes, polímeros, resinas, aceites, aditivos alimenticios, biocolorantes, adhesivos, disolventes y lubricantes.

Extracción de copolímeros de PHB-co-4HB a partir de biomasa

Se extrajo el copolímero de PHB-co-4HB tal como se describe en las patentes estadounidenses n.^{os} 7.713.720 y 7.252.980.

Determinación del peso molecular usando cromatografía de permeación en gel (GPC)

Se estima el peso molecular de PHA mediante cromatografía de permeación en gel usando un sistema de HPLC Waters Alliance equipado con un detector de índice de refracción. El conjunto de columnas es una serie de tres columnas PLGel 10 µm Mixed-B (Polymer Labs, Amherst, MA) con cloroformo como fase móvil bombeadas a 1 ml/min. El conjunto de columnas está calibrado con patrones de poliestireno de distribución estrecha. La muestra de PHA se disuelve en cloroformo a una concentración de 2,0 mg/ml a 60°C. La muestra se filtra con un filtro de jeringa de teflón de 0,2 µm. Se usa un volumen de inyección de 50 µl para el análisis. El cromatograma se analiza con el software de análisis Waters Empower GPC. Se notifican los pesos moleculares como pesos moleculares equivalentes de poliestireno.

Medición de las propiedades térmicas

La transición vítrea de los copolímeros de PHB-co-4HB se midió usando un calorímetro de barrido diferencial (DSC) TA Instruments Q100 con inyector automático. Se pesaron cuidadosamente 8-12 mg de una muestra de PHA en un recipiente de aluminio y se sellaron con una tapa de aluminio. La muestra se colocó luego en el DSC bajo una purga de nitrógeno y se analizó usando un ciclo de calor-frío-calor. El intervalo de calentamiento/enfriamiento fue de -80°C a 200°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min y una velocidad de enfriamiento de 5°C/min.

Determinación del contenido de base biológica

El contenido de base biológica del copolímero de PHB-co-4HB se midió mediante datación por radiocarbono basada en la norma ASTM D6866. La norma ASTM D6866 es el método aprobado por el Departamento de Agricultura de EE. UU. para determinar el contenido renovable/de base biológica de los materiales de variedad natural. El método proporciona una determinación porcentual del contenido de carbono fósil frente al contenido de carbono renovable o de biomasa de un producto o una combinación de combustible. La norma ASTM D6866 se usa ampliamente para certificar el contenido de base biológica de los bioplásticos.

Ejemplo 1: producción de PHB-co-4HB con contenido de comonomero de 4HB del 50% o más a partir de glucosa como única fuente de carbono

Este ejemplo muestra la producción de PHB-co-4HB con contenido de comonomero de 4HB del 50% o más a partir de glucosa como única fuente de carbono en células huésped de *E. coli* modificadas por ingeniería genética. Las cepas usadas en este ejemplo se enumeran en la tabla 2. Todas estas cepas se construyeron usando las

herramientas y los métodos de biotecnología bien conocidos descritos anteriormente. Todas contenían delecciones cromosómicas de *ynel* y *gabD* con la excepción de las cepas 31 y 32 que también contenían delecciones cromosómicas de *tesB*, *tesA*, *yciA* y *astD*.

5 Tabla 2. Cepas usadas en el ejemplo 1.

Cepas	Configuración de operón
31	$P_X\text{-}phaC3/C5\text{-}P_{uspA}\text{-}sucD\text{-}ssaR, P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5, P_{syn1}\text{-}kgdS\text{-}T_{1006}\text{-}P_{rpsU}\text{-}fucO_{16L\text{-}L7V}\text{-}orfZ150, P_{rpsU}\text{:} orfZ$
32	$P_X\text{-}phaC3/C5\text{-}P_{uspA}\text{-}sucD\text{-}ssaR, P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5, P_{synAF7}\text{-}kgdS\text{-}T_{1006}\text{-}P_{rpsU}\text{-}fucO_{16L\text{-}L7V}\text{-}orfZ150, P_{rpsU}\text{:} orfZ$
16	$P_X\text{-}phaC3/C1^*\text{-}T_{trpL}\text{-}P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5\text{-}T_{1006}\text{-}P_{synH}\text{-}ssaR_{At}^*\text{-}sucD^*, P_{rpsU}\text{-}orfZ$
17	$P_X\text{-}phaC3/C1^*\text{-}T_{trpL}\text{-}P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5\text{-}T_{1006}\text{-}P_{synA}\text{-}ssaR_{At}^*\text{-}sucD^*, P_{rpsU}\text{-}orfZ$
19	$P_X\text{-}phaC3/C1^*\text{-}T_{trpL}\text{-}P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5\text{-}T_{1006}\text{-}P_{synM}\text{-}ssaR_{At}^*\text{-}sucD^*, P_{rpsU}\text{-}orfZ$
1	$P_X\text{-}phaC3/C5\text{-}T_{trpL}\text{-}P_{uspA}\text{-}sucD^*\text{-}ssaR_{At}^*, P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5, P_{rpsU}\text{-}orfZ$
20	$P_X\text{-}phaC3/C1^*\text{-}P_{uspA}\text{-}sucD^*\text{-}ssaR_{At}^*, P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5, P_{rpsU}\text{-}orfZ$
33	$P_X\text{-}phaC3/C5\text{-}P_{uspA}\text{-}sucD\text{-}ssaR, P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5; P_{synAF3}\text{-}kgdS\text{-}T_{1006}\text{-}P_{rpsU}\text{-}fucO_{16L\text{-}L7V}\text{-}orfZ150, P_{rpsU}\text{:} orfZ$

10 Las cepas se evaluaron en un ensayo de placa de agitación. El medio de producción consistió en sales mínimas E2 1x, sales mínimas E0 1x, MgSO₄ 5 mM y disolución de sales traza 1x. La fuente de carbono consistió en 40 g/l de glucosa para las cepas 31, 32 y 33, mientras que para todas las demás cepas en los ejemplos 1 a 5, la concentración de glucosa fue de 20 g/l. La disolución madre E2 50x consiste en NaNH₄HPO₄·4H₂O 1,28 M, K₂HPO₄ 1,64 M y KH₂CO₄ 1,36 M. La disolución madre E0 50x consiste en Na₂HPO₄ 1,28 M, K₂HPO₄ 1,64 M y KH₂CO₄ 1,36 M. La disolución de sales traza 1000x se prepara añadiendo por 1 l de HCl 1,5 N: 50 g de FeSO₄·7H₂O, 11 g de ZnSO₄·7H₂O, 2,5 g de MnSO₄·4H₂O, 5 g de CuSO₄·5H₂O, 0,5 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0,1 g de Na₂B₄O₇ y 10 g de CaCl₂·2H₂O.

15 Para examinar la producción de PHB-co-4HB, las cepas se cultivaron por triplicado durante la noche en tubos estériles que contenían 3 ml de LB y antibióticos apropiados. Después de completar el cultivo, se retiraron 60 µl de un tubo y luego se añadieron a 1440 µl de medio de producción. Los cultivos de 1500 µl resultantes se añadieron luego a tres pocillos de una placa de pocillos profundos Duetz como alícuotas de 500 µl. La placa de agitación se incubó a 37°C con agitación durante 6 horas y luego se cambió a 30°C durante 40 horas con agitación para todas las cepas de los ejemplos 1 a 5, excepto las cepas 31, 32 y 33 que se incubaron a 37°C con agitación durante 6 horas y luego se cambió a 28°C durante 42 horas con agitación. Posteriormente, se combinaron cultivos de los tres pocillos (1,5 ml en total) y se analizó el contenido de polímero. Al final del experimento, los cultivos se centrifugaron a 4150 rpm, se lavaron una vez con agua destilada, se congelaron a -80°C durante al menos 30 minutos y se liofilizaron durante la noche. Al día siguiente, se añadió una cantidad medida de sedimento celular liofilizado a un tubo de vidrio, seguido de 3 ml de reactivo de butanolisis que consiste en una mezcla de igual volumen de n-butanol al 99,9% y HCl 4,0 N en dioxano con 2 mg/ml de difenilmetano como patrón interno. Después de tapar los tubos, se agitaron brevemente en vórtex y se colocaron en un bloque de calor ajustado a 93°C durante seis horas con agitación en vórtex periódica. Posteriormente, el tubo se enfrió hasta temperatura ambiente antes de añadir 3 ml de agua destilada. El tubo se sometió a vórtex durante aproximadamente 10 s antes de centrifugar a 620 rpm (centrífuga de mesa Sorvall Legend RT) durante 2 minutos. Se pipeteó 1 ml de la fase orgánica en un vial de GC, que luego se analizó por cromatografía de gases-detección de ionización por llama (GC-FID) (Hewlett-Packard 5890 Serie II). La cantidad de PHA en el sedimento celular se determinó mediante la comparación con las curvas de calibración tanto para 3HB como 4HB (para el análisis de PHB-co-4HB). La curva de calibración de 4HB se generó añadiendo diferentes cantidades de una disolución al 10% de γ -butirolactona (GBL) en butanol para separar las reacciones de butanolisis. La curva de calibración de 3HB se generó añadiendo diferentes cantidades de 3-hidroxibutirato de etilo al 99% para separar las reacciones de butanolisis.

40 Todos los exámenes para la producción de PHB-co-4HB se realizaron por triplicado tal como se indicó anteriormente. Se examinaron algunas cepas para la producción de polímeros de esta manera en diferentes días. Los resultados representativos para cada cepa sometida a prueba se muestran en la tabla 3, y demuestran que el % de contenido de 4HB para cada composición de copolímero fue del 50% o más.

Tabla 3. Producción de polímero de PHB-co-4HB a partir de cepas microbianas.

Cepas	Título de biomasa (g/l)	Título de PHA (g/l)	Composición de PHA (% de 4HB)
31	6,6 ± 0,3	3,7*	84,6*
32	8,1 ± 0,1	4,8*	74,8*
16	7,2 ± 0,1	4,5 ± 0,0	69,7 ± 0,0
17	6,9 ± 0,1	4,3 ± 0,1	69,4 ± 0,5
19	7,0 ± 0,0	4,2 ± 0,1	65,8 ± 1,2
1	5,1 ± 0,1	2,9 ± 0,0	64,5 ± 0,7
20	5,6 ± 0,1	3,4 ± 0,1	63,9 ± 0,5
33	7,9 ± 0,2	3,2*	50,3*

* mediciones de réplicas no disponibles

5 Ejemplo 2: producción de PHB-co-4HB con contenido de comonomero de 4HB entre el 40% y el 50% a partir de glucosa como única fuente de carbono

10 Este ejemplo muestra la producción de PHB-co-4HB con un contenido de comonomero de 4HB entre el 40 y el 50% a partir de glucosa como única fuente de carbono en células huésped de *E. coli* modificadas por ingeniería genética. Las cepas usadas en este ejemplo se enumeran en la tabla 4. Todas estas cepas se construyeron usando las herramientas y los métodos de biotecnología bien conocidos descritos anteriormente. Todas contenían delecciones cromosómicas de *ynel* y *gabD*.

15 Tabla 4. Cepas usadas en el ejemplo 2.

Cepas	Configuración de operón
23	$P_X\text{-}phaC3/C33^* - T_{trpL}\text{-}P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5\text{-}ssaR_{At}^* \text{-}sucD^*, P_{rpsU}\text{-}orfZ$
22	$P_X\text{-}phaC3/C1^* \text{-}P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5\text{-}ssaR_{At}^* \text{-}sucD^*, P_{rpsU}\text{-}orfZ$
21	$P_X\text{-}phaC3/C1^* \text{-}T_{trpL}\text{-}P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5\text{-}T_{1006}\text{-}P_{sincronizar}\text{-}ssaR_{At}^* \text{-}sucD^*, P_{rpsU}\text{-}orfZ$
2	$P_X\text{-}phaC3/C5\text{-}T_{trpL}\text{-}P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5\text{-}T_{1006}\text{-}P_{sincronizar}\text{-}ssaR_{At}^* \text{-}sucD^*, P_{rpsU}\text{-}orfZ$
3	$P_X\text{-}phaC3/C5\text{-}T_{trpL}\text{-}P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5\text{-}ssaR_{At}^* \text{-}T_{1006}\text{-}P_{synH}\text{-}sucD^*, P_{rpsU}\text{-}orfZ$

20 Las cepas se hicieron crecer y el contenido de polímero se analizó de la misma manera que se describe en el ejemplo 1. Los resultados representativos para cada cepa sometida a prueba se muestran en la tabla 5, y demuestran que el % del contenido de 4 HB para cada composición de copolímero estaba entre el 40% y el 50%.

Tabla 5. Producción de polímero de PHB-co-4HB a partir de cepas microbianas.

Cepas	Título de biomasa (g/l)	Título de PHA (g/l)	Composición de PHA (% de 4HB)
23	7,0 ± 0,1	4,7 ± 0,2	46,0 ± 3,0
22	6,6 ± 0,1	4,3 ± 0,1	43,6 ± 1,5
21	6,7 ± 0,2	4,0 ± 0,3	41,6 ± 1,3
2	4,7 ± 0,0	2,7 ± 0,1	41,5 ± 0,4
3	5,7 ± 0,0	3,5 ± 0,0	40,4 ± 1,2

25 Ejemplo 3: producción de PHB-co-4HB con contenido de comonomero de 4HB entre el 30% y el 40% a partir de glucosa como única fuente de carbono

Este ejemplo muestra la producción de PHB-co-4HB con un contenido de comonomero de 4HB entre el 30 y el 40% a partir de glucosa como única fuente de carbono en células huésped de *E. coli* modificadas por ingeniería genética. Las cepas usadas en este ejemplo se enumeran en la tabla 6. Todas estas cepas se construyeron usando las herramientas y los métodos de biotecnología bien conocidos descritos anteriormente. Todas contenían deleciones cromosómicas de *ynel* y *gabD*.

5

Tabla 6. Cepas usadas en el ejemplo 3.

Cepas	Configuración de operón
26	P_{uspA} - <i>phaC3/C1</i> * - <i>phaA5-phaB5-ssaRA_t</i> * - <i>sucD</i> * , P_{rpsU} - <i>orfZ</i>
4	P_X - <i>phaC3/C5-T_{trpL}</i> - P_{uspA} - <i>phaA5-phaB5-ssaRA_t</i> * - T_{1006} - P_{synM} - <i>sucD</i> * , P_{rpsU} - <i>orfZ</i>
5	P_X - <i>phaC3/C5-T_{trpL}</i> - P_{uspA} - <i>ssaRA_t</i> * - P_{syn1} - <i>phaA5-</i> <i>phaB5-sucD</i> * , P_{rpsU} - <i>orfZ</i>
6	P_X - <i>phaC3/C5-T_{trpL}</i> - P_{uspA} - <i>phaA5-phaB5-T1006-</i> <i>ssaRA_t</i> *- <i>sucD</i> * , P_{rpsU} - <i>orfZ</i>
7	P_X - <i>phaC3/C5-T_{trpL}</i> - P_{uspA} - <i>phaA5-phaB5-ssaRA_t</i> * - <i>sucD</i> * , P_{rpsU} - <i>orfZ</i>
27	P_X - <i>phaC3/C1</i> * - T_{trpL} - P_{uspA} - <i>phaA5-phaB5-T1006-</i> <i>ssaRA_t</i> * - <i>sucD</i> * , P_{rpsU} - <i>orfZ</i>

10

Las cepas se hicieron crecer y el contenido de polímero se analizó de la misma manera que se describe en el ejemplo 1. Los resultados representativos para cada cepa sometida a prueba se muestran en la tabla 7, y demuestran que el % de contenido de 4HB para cada composición de copolímero estaba entre el 30% y el 40%.

15 Tabla 7. Producción de polímero de PHB-co-4HB a partir de cepas microbianas.

Cepas	Título de biomasa (g/l)	Título de PHA (g/l)	Composición de PHA (% de 4HB)
26	7,7 ± 0,0	5,3 ± 0,1	39,3 ± 0,3
4	6,5 ± 0,1	4,3 ± 0,1	39,2 ± 1,6
5	5,9 ± 0,1	4,0 ± 0,2	35,9 ± 0,9
6	5,7 ± 0,2	2,8 ± 0,0	34,6 ± 2,1
7	6,1 ± 0,3	3,8 ± 0,1	32,2 ± 0,9
27	6,7 ± 0,2	4,0 ± 0,1	31,7 ± 1,3

Ejemplo 4: producción de PHB-co-4HB con contenido de comonomero de 4HB entre el 20% y el 30% a partir de glucosa como única fuente de carbono

20

Este ejemplo muestra la producción de PHB-co-4HB con un contenido de comonomero de 4HB entre el 20 y el 30% a partir de glucosa como única fuente de carbono en células huésped de *E. coli* modificadas por ingeniería genética. Las cepas usadas en este ejemplo se enumeran en la tabla 8. Todas estas cepas se construyeron usando las herramientas y los métodos de biotecnología bien conocidos descritos anteriormente. Todas contenían deleciones cromosómicas de *ynel* y *gabD*.

25

Tabla 8. Cepas usadas en el ejemplo 4.

Cepas	Configuración de operón
8	P_X - <i>phaC3/C5-T_{trpL}</i> - P_{uspA} - <i>phaA5-phaB5-T1006-P_{synH}-ssaRA_t</i> * - <i>sucD</i> * , P_{rpsU} - <i>orfZ</i>
28	P_{syn1} - <i>phaC1-P_{uspA}-sucD</i> * - <i>ssaRA_t</i> * - P_{syn1} - <i>phaA5-phaB5</i> , P_{rpsU} - <i>orfZ</i>
10	P_X - <i>phaC3/C5-T_{trpL}</i> - P_{uspA} - <i>sucD</i> * - <i>ssaRA_t</i> * - P_{syn1} - <i>phaA5-</i> <i>phaB5</i> , P_{rpsU} - <i>orfZ</i>

25	$P_{uspA}\text{-}phaC3/C1^* \text{-}sucD^* \text{-}ssaRA_t^*, P_{syn1}\text{-}phaA5\text{-}phaB5, P_{rpsU}\text{-}orfZ$
9	$P_{uspA}\text{-}phaC3/C5\text{-}phaA5\text{-}phaB5\text{-}ssaRA_t^* \text{-}sucD^*, P_{rpsU}\text{-}orfZ$
11	$P_X\text{-}phaC3/C5, T_{trpL}\text{-}P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5, P_{rpsU}\text{-}orfZ, sucD^* \text{-}ssaRA_t^*$
29	$P_X\text{-}phaC3/C1^* \text{-}T_{trpL}\text{-}P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5\text{-}T_{1006}\text{-}sucD^* \text{-}ssaRA_t^*, P_{rpsU}\text{-}orfZ$

Las cepas se hicieron crecer y el contenido de polímero se analizó de la misma manera descrita en el ejemplo 1. Los resultados representativos para cada cepa sometida a prueba se muestran en la tabla 9, y demuestran que el % de contenido de 4HB para cada composición de copolímero estaba entre el 20% y el 30%.

5

Tabla 9. Producción de polímero de PHB-co-4HB a partir de cepas microbianas.

Cepas	Título de biomasa (g/l)	Título de PHA (g/l)	Composición de PHA (% de 4HB)
8	4,5 ± 0,1	2,2 ± 0,2	28,6 ± 2,6
28	5,6 ± 0,1	4,4 ± 0,1	27,5 ± 0,4
10	6,5 ± 0,0	4,3 ± 0,0	27,5 ± 0,3
25	6,4 ± 0,0	5,2 ± 0,1	26,3 ± 0,1
9	6,2 ± 0,0	3,9 ± 0,0	25,8 ± 0,3
11	5,4 ± 0,2	2,4 ± 0,2	24,7 ± 2,0
29	5,7 ± 0,2	3,0 ± 0,1	22,5 ± 0,8

Ejemplo 5: producción de PHB-co-4HB con contenido de comonomero 4HB entre el 1% y el 20% a partir de glucosa como única fuente de carbono [fuera del alcance de la invención]

10

Este ejemplo muestra la producción de PHB-co-4HB con un contenido de comonomero de 4HB entre el 1 y el 20% a partir de glucosa como única fuente de carbono en células huésped de *E. coli* modificadas por ingeniería genética. Las cepas usadas en este ejemplo se enumeran en la tabla 10. Todas estas cepas se construyeron usando las herramientas y los métodos de biotecnología bien conocidos descritos anteriormente. Todas contenían delecciones cromosómicas de *ynel* y *gabD*.

15

Tabla 10. Cepas usadas en el ejemplo 5.

Cepas	Configuración de operón
13	$P_X\text{-}phaC3/C5, T_{trpL}\text{-}P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5, P_{rpsU}\text{-}orfZ, sucD^* \text{-}ssaRA_t^*$
12	$P_X\text{-}phaC3/C5\text{-}T_{trpL}\text{-}P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5\text{-}T_{1006}\text{-}sucD^*\text{-}ssaRA_t^*, P_{rpsU}\text{-}orfZ$
14	$P_X\text{-}phaC3/C5\text{-}T_{trpL}\text{-}P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5\text{-}ssaRA_t^*\text{-}T_{1006}\text{-}sucD^*, P_{rpsU}\text{-}orfZ$
30	$P_X\text{-}phaC3/C1^*\text{-}T_{trpL}\text{-}P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5\text{-}ssaRA_t^*\text{-}T_{1006}\text{-}SucD^*, P_{rpsU}\text{-}orfZ$
15	$P_X\text{-}phaC3/C5, T_{trpL}\text{-}P_{uspA}\text{-}phaA5\text{-}phaB5, P_{rpsU}\text{-}orfZ, sucD^*\text{-}ssaRA_t^*$

20

Las cepas se hicieron crecer y el contenido de polímero se analizó de la misma manera descrita en el ejemplo 1. Los resultados representativos para cada cepa sometida a prueba se muestran en la tabla 11, y demuestran que el % de contenido de 4HB para cada composición de copolímero estaba entre el 1% y el 20%.

25

Tabla 11. Producción de polímero de PHB-co-4HB a partir de cepas microbianas.

Cepas	Título de biomasa (g/l)	Título de PHA (g/l)	Composición de PHA (% de 4HB)
13	5,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	18,8 ± 0,4

ES 2 747 230 T3

12	6,1 ± 0,1	3,2 ± 0,2	10,1 ± 0,7
14	5,4 ± 0,1	2,5 ± 0,1	6,4 ± 0,5
30	4,1 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,3
15	4,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,3

Ejemplo 6: extracción de copolímeros de PHB-co-4HB y determinación de pesos moleculares y polidispersidad

5 Para la purificación de cantidades mayores de copolímeros de PHB-co-4HB, las cepas 1, 5 y 12 con diversas composiciones de PHA tal como se muestra en el ejemplo 1 se cultivaron en primer lugar en 20 ml de medio LB en matraces de agitación de 250 ml a 37°C durante la noche. Todo el volumen se transfirió luego a matraces de agitación aforados de 1 litro que contenían 500 ml de un medio de producción compuesto por sales mínimas E2 1x, sales mínimas E0 1x, MgSO₄ 5 mM, 30 g/l de glucosa y disolución de sales traza 1x. Las sales mínimas E2 y E0 y la disolución de sales traza se describen en el ejemplo 1. Los cultivos de 500 ml se incubaron a 37°C con agitación durante 6 horas y luego se cambiaron a 28°C durante 70 horas con agitación. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 6000 x g, se lavaron una vez con agua destilada, se congelaron a -80°C durante al menos 30 minutos y se liofilizaron durante la noche.

15 El copolímero de las cepas 1, 5 y 12 se purificó a partir de biomasa seca extrayendo en primer lugar con ciclohexanona a 65-70°C durante 30 minutos antes de centrifugar a 2000 x g durante 5 minutos. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se mezcló con un volumen igual de heptano a 5-10°C. El polímero precipitado resultante se filtró y se secó durante la noche a temperatura ambiente.

20 Los pesos moleculares de los copolímeros purificados se determinaron usando cromatografía de permeación en gel (GPC) usando un sistema de HPLC Waters Alliance. La tabla 12 muestra los pesos moleculares promedio en peso (M_w), los pesos moleculares promedio en número (M_n) y el índice de polidispersidad (PD) medidos a partir de los copolímeros purificados de las cepas 1, 5 y 12.

25 Tabla 12. Pesos moleculares y polidispersidad de copolímeros producidos por las cepas 1, 5 y 12.

Cepas	M _w (g/mol)	M _n (g/mol)	PD
1	950.040	537.150	1,769
5	1.227.939	659.590	1,862
12	1.271.813	636.416	1,998

Ejemplo 7: determinación de la composición de PHA y la temperatura de transición vítrea de los copolímeros de PHB-co-4HB

30 Los copolímeros purificados de las cepas 1, 5 y 12 tal como se describe en el ejemplo 6 se usaron para determinar la composición de PHA tal como se resalta en el ejemplo 1. La temperatura de transición vítrea (T_g) se midió usando análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC). La tabla 13 enumera el contenido de 4HB y la T_g medidos a partir de los copolímeros purificados de las cepas 1, 5 y 12. La temperatura de transición vítrea disminuyó con un mayor contenido de 4HB en el copolímero.

35 Tabla 13. Producción de polímero de PHB-co-4HB y T_g medidos a partir de los copolímeros purificados de las cepas 1, 5 y 12.

Cepas	Título de biomasa (g/l)	Título de PHA (g/l)	Composición de PHA (% de 4HB)	T _g (°C)
1	8,0	4,7	56	-25,93
5	10,0	6,6	33	-21,32
12	6,8	3,9	19	-12,93

Ejemplo 8: determinación del contenido de base biológica de un copolímero PHB-co-4HB

40 El copolímero purificado de la cepa 1 tal como se describe en el ejemplo 6 se usó para determinar el contenido de base biológica mediante datación por radiocarbono basada en la norma ASTM D6866 de Beta Analytic (Miami, Florida, EE. UU.). Se determinó que el copolímero purificado de la cepa 1 contenía un contenido de base biológica del 97%.

Ejemplo 9: producción de PHB-co-4HB a partir de glicerol como única fuente de carbono

Las cepas 1 y 6 se hicieron crecer y el contenido de polímero se analizó de la misma manera tal como se describió en el ejemplo 1, con la excepción de que el hidrato de carbono alimentado fue 30 g/l de glicerol en lugar de 20 g/l de glucosa. Un resultado representativo para ambas cepas se muestra en la tabla 14.

5

Tabla 14. Producción de polímero de PHB-co-4HB a partir de glicerol como única fuente de carbono.

Cepas	Título de biomasa (g/l)	Título de PHA (g/l)	Composición de PHA (% de 4HB)
1	5,5 ± 0,3	2,1 ± 0,1	45 ± 3
6	4,8 ± 0,2	1,5 ± 0,1	18 ± 2

Secuencia de nucleótidos de ID del gen 001: gen *sucD** de succinato-semialdehído deshidrogenasa de *Clostridium kluyveri*

10

ATGTCCAACGAGGTTAGCATTAAAGGAGCTGATTGAGAAGGCCAAAAGTGGCGC
 AGAAAAAGCTGGAAGCGTATAGCCAAGAGCAAGTTGACGTTCTGGTCAAGGCGTGGGTAAAGTTGTG
 TACGACAACGCCGAGATGTTCCGCGAAAAGAGGCGGTGGAGGAAACCGAGATGGGTGTTTACGAGGATAA
 AGTGGCTAAATGTCATCTGAAATCTGGTGCAATCTGGAATCACATTAAAGATAAGAAAACCGTTGGTA
 TTATCAAGGAAGAACCAGGAGCGTGCCTGGTGTACGTCGGAAGCCTAAAGGTGTTGTGGCGGCGACG
 ACCCCTATACCAATCCTGTGGTTACCCCGATGTGTAACGCGATGGCAGCAATTAAGGTGCGAACAC
 CATCATTTGTCGCCCCGCATCCGAAGGCGAAGAAGGTGAGCGCGCACACCGTGGAGCTGATGAATGCAG
 AACTGAAAAAGTTGGGTGCGCCGAAAACATTATCCAGATCGTTGAAGCCCCAAGCCGTGAAGCAGCC
 AAGGAGTTGATGGAGAGCGCAGACGTGGTTATCGCCACGGGTGGCGCAGGCCGTGTTAAAGCAGCGTA
 CTCTCCGGCCGTCCGGCATAACGGTGTCCGGTCCGGGCAATTCTCAGGTCATTGTCGATAAGGGTTACG
 ATTATAACAAAGCTGCCCAGGACATCATTACCGGCCGCAAGTATGACAACGGTATCATTTGCAGCTCT
 GAGCAGAGCGTGATCGCACCGGCGGAGGACTACGACAAGGTCATCGCGGCTTTCGTCGAGAATGGCGC
 GTTCTATGTCGAGGATGAGGAACTGTGGAGAAATTCGTAGCACGCTGTTCAAGGATGGCAAGATCA
 ATAGCAAAATCATCGGTAAATCCGTGCAGATCATCGCTGACCTGGCTGGTGTCAAGGTGCCGGAAGGC
 ACCAAGGTGATCGTGTGAAGGGCAAGGGTGCCGGTGAAGAGGACGTTCTGTGCAAGGAGAAAATGTG
 CCCGGTCTGGTTGCCCTGAAATATGACACCTTTGAGGAGGCGGTGAGATCGCGATGGCCAACTATA
 TGTACGAGGGTGCGGGCCATACCGCGGTATCCACAGCGATAACGACGAGAATATCCGCTACGCGGGT
 ACGGTGCTGCCAATCAGCCGTCTGGTTGTCAACCAGCCAGCAACTACGGCCGGTGGTAGCTTTAACAA
 TGGTTTTAATCCGACCACCACCTTGGGCTGCGGTAGCTGGGGCCGTAACCTCATTAGCGAGAACCTGA
 CGTATGAGCATCTGATTAATGTCAGCCGTATTGGCTATTTCAATAAGGAGGCCAAAAGTTCCCTAGCTAC
 GAGGAGATCTGGGGTTAA (SEQ ID NO: 16)

15 Secuencia de aminoácidos de ID del gen 001: gen *SucD** de succinato-semialdehído deshidrogenasa de *Clostridium kluyveri*

MSNEVSIKELIEKAKVAQKKLEAYSQEQVDVLVKALGKVVYDNAEMFAKEAV
 EETEMGVYEDKVAKCHLKSGAIWNHDKKTVGIIKEEPERALVYVAKPKGVVAATTPITNPVVTPMC
 NAMAAIKGRNTIIIVAPHPKAKKVSHTVELMNAELKKGAPENIIQIVEAPSREAAKELMESADVIA
 TGGAGRVKAAAYSSGRPYPAYGVGPGNSQVIVDKGYDYNKAAQDIITGRKYDNGIICSSEQSVIAPAEDYD
 KVIAAFVENGAFFVEDEETVEKFRSTLFDKDKINSKIIGKSVQIIADLAGVKVPEGTKVIVLKGKAG
 EKDVLCCKEMCPVLVALKYDTFEEAVEIAMANYMYEGAGHTAGIHSNDNENIRYAGTVLPI SRLVNVQ
 PATTAGGSFNNGFNPTTTLGCSSWGRNSISENLTYEHLINVSRIYGFNKEAKVPSYEEIWG (SEQ ID
 NO: 17)

20 Secuencia de nucleótidos de ID del gen 002: gen *SsaR_{A1}** de semialdehído succínico reductasa de *Arabidopsis*

ES 2 747 230 T3

thaliana

ATGGAAGTAGGTTTTCTGGGTCTGGGCATTATGGGTAAAGCTATGTCCATGA
ACCTGCTGAAAAACGGTTTTCAAAGTTACCGTGTGGAACCGCACTCTGTCTAAATGTGATGAACCTGGTT
GAACACGGTGCAAGCGTGTGCGAGTCTCCGGCTGAGGTGATCAAGAAATGCAAATACACGATCGCGAT
GCTGAGCGATCCGTGTGCAGCTCTGTCTGTTGTTTTTCGATAAAGGCGGTGTTCTGGAACAGATCTGCC
AGGGTAAGGGCTACATCGACATGTCTACCGTCGACCGGAAACTAGCCTGAAAATTAACGAAGCGATC
ACGGGCAAAGGTGGCCGTTTTGTAGAAGGTCCTGTTAGCGGTTCCAAAAAGCCGGCAGAAGACGGCCA
GCTGATCATCCTGGCAGCAGGCGACAAAGCACTGTTTCGAGGAATCCATCCCGCCTTTGATGTACTGG
GCAAACGTTCTTTTTATCTGGGTGAGGTGGGTAACGGTGCGAAAATGAAACTGATTGTTAACATGATC
ATGGGTTCTATGATGAACCGGTTTAGCGAAGGTCTGGTACTGGCAGATAAAAAGCGGTCTGTCTAGCGA
CACGCTGCTGGATATTCTGGATCTGGGTGCTATGACGAATCCGATGTTCAAAGGCAAAGGTCCGTCCA
TGACTAAATCCAGCTACCCACCGGCTTTCCCGCTGAAACACCAGCAGAAAGACATGCGTCTGGCTCTG
GCTCTGGGCGACGAAAACGCTGTTAGCATGCCGGTCGCTGCGGCTGCGAACGAAGCCTTCAAGAAAGC
CCGTAGCCTGGGCTGGGCGATCTGGACTTTTTCTGCTGTTATCGAAGCGGTAAAATTCTCTCGTGAAT
AA (SEQ ID NO: 18)

5 Secuencia de aminoácidos de ID del gen 002: gen SsaR_{At}* de semialdehído succínico reductasa de *Arabidopsis thaliana*

MEVGFLGLGIMGKAMSMNLLKNGFKVTVVWNRSLSKDELVEHGASVCESPA
VIKKCKYTIAMLSDPAAALS VVFDKGGVLEQICEGKGYIDMSTVDAETSLKINEAITGKGRFVEGPV
SGSKKPAEDGQLIILAAGDKALFEESI PAFDVLGKRSFYLGQVNGAKMKLIVNMIMGSMNNAFSEGL
VLADKSGLSSDTLLDILDGAMTNPMFKGKGPSMTKSSYPFAFPLKHQQKDMRLALALGDENAVSMPV
AAAANEAFKKARSLGLGLDLDFAVIEAVKFSRE (SEQ ID NO: 19)

10 Secuencia de nucleótidos de ID del gen 003: L-1,2-propanodiol oxidorreductasa fucO_{16L-L7V} de *Escherichia coli* cepa K-12 subcepa MG1655

ATGATGGCTAACAGAATGCTGGTGAACGAAACGGCATGGTTTTGGTCGGGGTG
CTGTTGGGGCTTTAACCGATGAGGTGAAACGCCGTGGTTATCAGAAGCGCTGATCGTACCATAAA
ACGCTGGTGCAATGCGGCGTGGTGGCGAAAGTGACCGATAAGATGGATGCTGCAGGGCTGGCATGGGC
GATTTACGACGGCGTAGTGCCCAACCAACAATTACTGTCTCAAAGAAGGGCTCGGTGTATTCCAGA
ATAGCGGCGCGGATTACCTGATCGCTATTGGTGGTGGTTCTCCACAGGATACTTGTAAGCGATTGGC
ATTATCAGCAACAACCCGGAGTTTGCCGATGTGCGTAGCCTGGAAGGGCTTTCCCGACCAATAAACC
CAGTGTACCGATTCTGGCAATTCCTACCACAGCAGGTACTGCGGCAGAAGTGACCATTAACACTACGTGA
TCACTGACGAAGAGAAACGGCGCAAGTTTGTGTTGCGTTGATCCGCATGATATCCCGCAGGTGGCCTTT
ATTGACGCTGACATGATGGATGGTATGCCCTCCAGCGCTGAAAGCTGCGACGGGTGTCGATGCGCTCAC
TCATGCTATTGAGGGGTATATTACCCGTGGCGCGTGGGCGCTAACCGATGCACTGCACATTAAGCGA
TTGAAATCATTGCTGGGGCGCTGCGAGGATCGGTTGCTGGTGATAAGGATGCCGGAGAAGAAATGGCG
CTCGGGCAGTATGTTGCGGGTATGGGCTTCTCGAATGTTGGGTTAGGGTTGGTGCATGGTATGGCGCA
TCCACTGGGCGCGTTTTATAACTCCACACGGTGTGCGAACGCCATCCTGTTACCGCATGTCATGC
GTTATAACGCTGACTTTACCGGTGAGAAGTACCAGCATATCGCGCGCGTTATGGGCGTGAAAGTGAA
GGTATGAGCCTGGAAGAGGCGGTAATGCCGCTGTTGAAGCGGTGTTGCTCTCAACCGTGATGTCCG
TATCCGCCACATTTGCGTGTGTTGGTGTACGCAAGGAAGACATTCGGGCACTGGGCGAGGCGGCAC
TGGATGATGTTTGTACCGGTGGCAACCCGCTGAAGCAACGCTTGAGGATATTGTAGAGCTTTACCAT
ACCGCCTGGTAA (SEQ ID NO: 20)

ES 2 747 230 T3

- 5 Secuencia de aminoácidos de ID del gen 003: L-1,2-propanodiol oxidorreductasa fucO_{16L-L7V} de *Escherichia coli* cepa K-12 subcepa MG1655

MANRMLVNETAWFGRGAVGALTDEVKRRGYQKALIVTDKTLVQCGVVAKVTD
KMDAAGLAWAIYDGVVNPNTITVVKEGLGVFQNSGADYLIAIGGGSPQDTCKAIGIISNNPEFADVRS
LEGLSPTNKPSVPILAIPTTAGTAAEVTINYVITDEEKRRKFVCDPHDIPQVAFIDADMMDGMPPAL
KAATGVDALTHAIEGYITRGAWALTDALHIKAIEIIAGALRGSVAGDKDAGEEMALGQYVAGMGFSNV
GLGLVHGMAHPLGAFYNTPHGVANAILLPHVMRYNADFTGEKYRDIARVMGVKVEGMSLEEARNAAVE
AVFALNRDVGI PPHLRDVGVRKEDI PALAQAALDDVCTGGNPREATLEDIVELYHTAW (SEQ ID
NO: 21)

- 10 Secuencia de nucleótidos de ID del gen 004: gen de fusión phaC3/C5 de polihidroxicanoato sintasa de *Pseudomonas putida/Zoogloea ramigera*

ATGAGTAACAAGAACAACGATGAGCTGCAGTGGCAATCCTGGTTCAGCAAGG
CGCCCACCACCGAGGCGAACCCGATGGCCACCATGTTGCAGGATATCGGCGTTGCGCTCAAACCGGAA
GCGATGGAGCAGCTGAAAAACGATTATCTGCGTGACTTCACCGCGTTGTGGCAGGATTTTTTGGCTGG
CAAGGCGCCAGCCGTCAGCGACCGCCGCTTCAGCTCGGCAGCCTGGCAGGGCAATCCGATGTCGGCCT
TCAATGCCGCATCTTACCTGCTCAACGCCAAATTCCTCAGTGCCATGGTGGAGGCGGTGGACACCGCA
CCCCAGCAAAGCAGAAAATACGCTTTGCCGTGCAGCAGGTGATTGATGCCATGTCGCCCCGGAACCT
CCTCGCCACCAACCCGGAAGCGCAGCAAAAACCTGATTGAAACCAAGGGCGAGAGCCTGACCGGTGGCC
TGGTCAATATGCTGGGCGATATCAACAAGGGCCATATCTCGCTGTCGGACGAATCGGCCTTTGAAGTG
GGCCGCAACCTGGCCATTACCCCGGCACCGTGATTTACGAAAATCCGCTGTTCCAGCTGATCCAGTA
CACGCCGACCACGCCGACGGTCAGCCAGCGCCCGCTGTTGATGGTGCCGCGTGATCAACAAGTTCT
ACATCCTCGACCTGCAACCGGAAAATTCGCTGGTGCCTACGCGGTGGAGCAGGGCAACACCGTGTTT
CTGATCTCGTGGAGCAATCCGGACAAGTCGCTGGCCGGCACCACCTGGGACGACTACGTGGAGCAGGG
CGTGATCGAAGCGATCCGCATCGTCCAGGACGTGAGCGGCCAGGACAAGCTGAACATGTTCCGGCTTCT
GCGTGGGCGGCACCATCGTTGCCACCGCACTGGCGGTACTGGCGGCGCGTGGCCAGCACCCGGCGGCC
AGCCTGACCCTGCTGACCACCTTCCTCGACTTCAGCGACACCGCGTGCTCGACGTCTTCGTGATGA
AACCCAGGTGCGCTGCGTGAACAGCAATTGCGCGATGGCGGCCTGATGCCGGGCCGTGACCTGGCCT
CGACCTTCTCGAGCCTGCGTCCGAACGACCTGGTATGGAACCTATGTGCAGTCAACTACCTCAAAGGC
AATGAGCCGGCGGCTTTGACCTGCTGTTCTGGAATTCGGACAGCACC AATTTGCCGGGCCGATGTT
CTGCTGGTACCTGCGCAACACCTACCTGGAAAACAGCCTGAAAGTGCCGGGCAAGCTGACGGTGGCCG
GCGAAAAGATCGACCTCGGCCTGATCGACCCCCGGCCTTCATCTACGGTTCGCGCGAAGACCACATC
GTGCCGTGGATGTCGGCGTACGGTTCGCTCGACATCCTCAACCAGGGCAAGCCGGGCGCAACCGCTT
CGTGCTGGGCGCGTCCGGCCATATCGCCGGCGTGATCAACTCGGTGGCCAAGAACAAGCGCAGCTACT
GGATCAACGACGGTGGCGCCGCCGATGCCAGGCCTGGTTTCGATGGCGCGCAGGAAGTCCCGGGCAGC
TGGTGGCCGCAATGGGCGGGTTCCTGACCCAGCATGGCGGCAAGAAGGTCAAGCCCAAGGCCAAGCC
CGGCAACGCCCGCTACACCGCGATCGAGGCGGCGCCCGCCGTTACGTCAAAGCCAAGGGCTGA
(SEQ ID NO: 22)

- 15 Secuencia de aminoácidos de ID del gen 004: gen de fusión phaC3/C5 de polihidroxicanoato sintasa de *Pseudomonas putida/Zoogloea ramigera*

ES 2 747 230 T3

MSNKNNDLQWQSWFSKAPTTEANPMATMLQDIGVALKPEAMEQLKNDYLRD
FTALWQDFLAGKAPAVSDRRFSSAAWQGNPMSAFNAASYLLNAKFLSAMVEAVDTAPQQKQKIRFAVQ
QVIDAMSPANFLATNPEAQKLIETKGESLTRGLVNMLGDINKGHISLSDESAFEVGRNLAITPGTVI
YENPLFQLIQYTPPTPTVSQRPLLMVPPCINKFYILDLPENSLVRYAVEQGNTVFLISWSNPKSLA
GTTWDDYVEQGVIEAIRIVQDVSGQDKLNMFGFCVGGTIVATALAVLAARGQHPAASLTLTFLDFE
DTGVLDFVDETTQVALREQLRDLGGLMPGRDLASTFSSLRPNDLVWNYVQSNYLKGNPAAFDLLEFWN
SDSTNLPGPMFCWYLRNTYLENSLKVPGKLTVAGEKIDLGLIDAPAFIYGSREDHIVPMSAYGSLDI
LNQKPGANRFVLGASGHIAGVINSVAKNKRYSWINDGGAADAQAWFDGAQEVPGSWWPQWAGFLTQH
GGKKVKPKAKPGNARYTAIEAAPGRYVKAG (SEQ ID NO: 23)

Secuencia de nucleótidos de ID del gen 005: gen de fusión phaC3/C1* de polihidroxicanoato sintasa de *Pseudomonas putida/Ralstonia eutropha* JMP134

5

ATGACTAGAAGGAGGTTTCATATGAGTAACAAGAACAACGATGAGCTGGCGA
CGGGTAAAGGTGCTGCTGCATCTTCTACTGAAGGTAAATCTCAGCCGTTTAAATCCCACCGGGTCCG
CTGGACCCGGCCACTTGGCTGGAATGGAGCCGTGAGTGGCAAGGTCGGGAGGGCAATGGCGGTACCGT
GCCGGGTGGCTTTCCGGGTTTCGAAGCGTTCGCGGCGTCCCCGCTGGCGGGCGTGAAAATCGACCCGG
CTCAGCTGGCAGAGATCCAGCAGCGTTATATGCGTGATTTACCGAGCTGTGGCGTGGTCTGGCAGGC
GGTGACACCGAGAGCGCTGGCAAACCTGCATGACCGTCGCTTCGCGTCCGAAGCGTGGCACAAAACGC
GCCGTATCGCTATACTGCGGCATTTTACCTGCTGAACGCACGTGCACTGACGGAACCTGGCTGATGCAG
TAGAAGCGGATCCGAAAACCCGTCAGCGTATCCGTTTTGCGGTTTCCAGTGGGTAGATGCTATGAGC
CCGGCTAACTTCTGGCCACCAACCCGGACGCTCAGAACCGTCTGATCGAGAGCCGTGGTGAAGCCT
GCGTGCCGGCATGCGCAATATGCTGGAAGATCTGACCCGCGGTAATAATTTCCCAAACCGATGAGACTG
CCTTCGAAGTAGGCCGTAACATGGCAGTTACCGAAGGTGCTGTGGTATTCGAAAACGAGTTCTTCCAG
CTGCTGCAGTACAAACCTCTGACTGACAAAGTATACACCCGTCGCTGCTGCTGGTACCGCCGTGCAT
TAAACAAGTTCTATATTCTGGACCTGCAGCCGGAAGGTTCTCTGGTCCGTTACGCAGTCGAACAGGGTC
ACACTGTATTCTGGTGGAGCTGGCGCAATCCAGACGCTAGCATGGCTGGCTGTACCTGGGATGACTAT
ATTGAAAACGCGGCTATCCGCGCCATCGAGGTTGTGCGTGATATCAGCGGTCAGGACAAGATCAACAC
CCTGGGCTTTTGTGTTGGTGGCAGCATCTCCTGACTGCCCTGGCGGTCCTGGCCGCCGTTGGTGGAGC
ACCCGGTGGCCTCTCTGACCCGCTGACTACCTGCTGGACTTCACCGATACTGGTATCTCTGGATGTT
TTCGTGGACGAGCCACACGTTTACGCTGCGTGAGGCGACTCTGGGCGGCGCCAGCGCGGCTGCTGCG
TGGTGTGAGCTGGCCAATACCTTTTCCCTTCCTGCGCCGAACGACCTGGTTTGGAACTACGTTGTTG
ACAACATCTGAAAGGCAACACCCCGTACCTTTTCGATCTGCTGTTCTGGAACGGTGTGCAACCAAC
CTGCCTGGTCCATGGTACTGTTGGTACCTGCGTCATACTTACCTGCAGAACGAACTGAAAGAGCCGGG
CAAACCTGACCGTGTGTAACGAACCTGTGGACCTGGGCGGATTAACGTTCTTACTTACATCTACGGTT
CCCGTGAAGATCACATCGTACCGTGGACCGGCTTACGCCAGCACCGCGCTGCTGAAGAACGATCTG
CGTTTCGTACTGGGCGCATCCGGCCATATCGCAGGTGTGATCAACCTCCTGCAAAGAAAAAGCGTTC
TCATTGGACCAACGACGCGCTGCCAGAATCCGCGCAGGATTGGCTGGCAGGTGCTGAGGAACACCATG
GTTCTGGTGGCCGATTGGATGACCTGGCTGGGTAACAAGCCGGTGCAAACCTGCAAGCTGCACTCAACT
GAATATGGTAGCAAGCGTTATGCTGCAATCGAGCCAGCGCCAGGCCGTTACGTTAAAGCGAAAGCATA
A (SEQ ID NO: 24)

10 Secuencia de aminoácidos de ID del gen 005: gen de fusión phaC3/C1* de polihidroxicanoato sintasa de *Pseudomonas putida/Ralstonia eutropha* JMP134 *

ES 2 747 230 T3

MSNKNNDELATGKGAASSTEGKSQPFKFPPLDPATWLEWSRQWQPEGN
GGTVPGGFPGFEAFAASPLAGVKIDPAQLAEIQQRYMRDFTELWRGLAGGDTE SAGKLDHRRFASEAW
HKNAPYRYTAAFYLLNARALTELEDAVEADPKTRQRI RFAVSQWVDAMSPANFLATNPDAQNRLIESR
GESLRAGMRNMLEDLTRGKISQTDETA FEVGRNMAVTEGAVVFENEFFQLQYKPLTDKVYTRPLLLV
PPCINKFYILDLPQEGSLVRYAVEQGH TVFLVSWRNPDASMAGCTWDDYIENAAIRAIEVVRDISGQD
KINTLGFCVGGTIIISTALAVLAARGEHPVASL TLLTLLDFTDGTGILDVFEVDEPHVQLREATLGGASG
GLLRGVELANTFSFLRPNDLVWNYVVDNYLKGNT PVPFDLLFWNGDATNLPGPWYCWYLRHTYLQNEL
KEPGKLTVCNEPVDLGAINVPTYIYGSREDHIVP WTAAYASTALLKNDLRFVLGASGHIAGVINPPAK
KKRSHWTNDALPESAQDWLAGAEHHG SWWPDWMTWLKQAGAKRAAPTEY GSKRYAAIEPAPGRYVK
AKA (SEQ ID NO: 25)

Secuencia de nucleótidos de ID del gen 006: gen de fusión phaC3/C33 de polihidroxicanoato sintasa de *Pseudomonas putida/Delftia acidovorans* 89-11-102

5

ATGAGTAACAAGAACAACGATGAGCTGGCGAAT TTCGACCCGCTGGCTGGCC
TGTCTGGTCAATCGGTGCAACAGT TCTGGAATGAGCAGTGGAGCCGTACCCTGCAGACCTTGCAGCAG
ATGGGTCAACCGGGCTGCCGGGCATTCAAGG TATGCCGGGTATGCCAGACATGGCACAAGCGTGGAA
AGCCGCTGTGCCGAACCGGGTGCACTGCCTGAGA ATGCGCTGTCTCTGGATCCGGAGAAGCTGCTGG
AACTGCAGCGTCAATATCTGGACGGTGCAAAAGCGATGGCAGAGCAGGGCGGTGCGCAAGCATTGCTG
GCAAAAAGATAAACGTTTCAATACCGAATCGTGGGCAGGTAATCCGCTGACGGCTGCGACCCGGCAAC
CTACCTGCTGAACTCCCGTATGCTGATGGGTCTGGCGGACGCTGTT CAGGCGGACGATAAGACCCGTA
ACCGTGTGCGTTTTGCGATTGAGCAGTGGCTGGCAGCGATGGCGCCGAGCAACTTCTGGCGCTGAAT
GCTGAGGCCCAAAAGAAGGCGATCGAGACTCAGGGCGAGAGCCTGGCCCAAGGCGTGGCGAACCTGCT
GGCGGATATGCGTCAGGGTCATGTCTCCATGACCGACGAAAGCCTGTTTACGGTGGGCAAGAACGTGG
CAACGACCGAAGGTGCGGTGTTTTTCGAGAATGAGCTGTTCCAGTTGATTGAGTATAAGCCGTTGACG
GATAAGGTGCATGAGCGCCCGTTCCCTGATGGTGCCCGCTGCATCAACAAATTCTATATCCTGGATCT
GCAACCGGACAACAGCCTGATCCGTTATGCCGTTAGCCAGGGCCATCGCACGTTCTGTCATGTCTCTGGC
GCAATCCAGACGAATCTCTGGCCCGTAAAACGTGGGATAACTACATCGAAGATGGCGTTCTGACGGGT
ATTCGCGTCGCGCGTGAGATTGCTGGTGCGGAGCAGATCAACGTTCTGGGTTTTTGTGTGGCGGCAC
TATGTTGAGCACC GCGTTGGCGGTTCTGCAAGCCCGCCACGACCGCGAGCAGGGCGCAGTCGCAGCAC
CAGCCGCTAAAGCGCCAGCGGCGAAACGTGCGGCAGGTAGCCGAGCGCGGCTCGTACGTCCACTGCC
CGTGCCACCGCCCCTGCAGGTGTTCCGTTCCCGGTTGCGAGCGTCACCTTGCTGACCACCTTTATCGA
TTTCTCCGACACCGGCATCCTGGACGTGTT CATTGATGAATCTGTCTCGTCCGTTTTTCGCGAGATGCAAA
TGGGTGAAGGTGGTTTTGATGAAGGGCCAAGACCTGGCGAGCACCTTTAGCTTTCTGCGCCGAATGAC
TTGGTTTTGGAATTACGTCGTGGGCAACTACCTGAAAGGTGAAACCCCTCCGCCGTTTGACCTGCTGTA
TTGGAACAGCGATAGCACCAACCTGCCGGGTCCG TACTACGCGTGGTACCTGCGTAATCTGTACCTGG
AAAATCGCCTGGCACAGCCGGGTGCGTTGACTGTTTGCGGTGAACGTATCGACATGCACCAGCTGCGT
CTGCCGGCGTACATCTATGGCAGCCGGAAGATCACATTGTTCCGTTGGTGGTAGCTATGCCAGCAC
CCAAGTGTGGGTGGTGATAAGCGCTTTGTGATGGGTGCGTCCG GTCACATTGCAGGCGTCATCAACC
CGCTGCAAAGAAGAAACGTAGCTACTGGCTGCGTGAAGATGGCCAGCTGCCGGCCAGCTGAAAGAG
TGGCAGGCCGGTGCCGACGAGTATCCTGGTAGCTGGTGGGCGGATTGGAGCCCGTGGCTGGCCGAGCA
CGGTGGCAAACCTGGTGGCAGCGCCGAAGCAATACGGCAAAGGCCGTGAGTACACGGCGATTGAACCGG
CTCCAGGCCGCTACGTTTTGGTCAAGGCGTAA (SEQ ID NO: 26)

Secuencia de aminoácidos de ID del gen 006: gen de fusión phaC3/C33 de polihidroxicanoato sintasa de

ES 2 747 230 T3

Pseudomonas putida/Delftia acidovorans 89-11-102

MSNKNNDELANFDPLAGLSGQSVQQFWNEQWSRTLQTLQQMGQPLPGIQGM
PGMPDMAQAWKAAVPEPGALPENALSLDPEKLELQRQYLDGAKAMAEQGGAQALLAKDKRFNTESWA
GNPLTAATAATYLLNSRMLMGLADAVQADDKTRNRVRFVFAIEQWLAAMAPSNFLALNAEAQKKA IETQG
ESLAQGVANLLADMRQGHVSMTDESLEFTVGNVATTEGAVVFENELFQLIEYKPLTDKVHERPFLMVP
PCINKFYILDLPDNLIRYAVSQGHRTFVMSWRNPDES LARKTWDNYIEDGVLTGIRVAREIAGAEQ
INVLGFCVGGTMLSTALAVLQARHDREHGAVAAPAAKAPAAKRAAGSRSAAARTSTARATAPAGVFPV
ASVTLTTFIDFSDTGILDVVIDESVVRVFREMOMGEGGLMKGQDLASTFSFLRPNDLVWNYVVGNYLK
GETPPFDLLYWNDSSTNLPGPYYAWYLRNLYLENRLAQPGALTVCGERIDMHQLRLPAYIYGSREDH
IVPVGGSYASTQVLGGDKRFVMGASGHIAGVINPPAKKKRSYWLREDGQLPATLKEWQAGADEYPGSW
5 WADWSPWLAEHGGKLVAAPKQYKGREYTAIEPAPGRYVLVKA (SEQ ID NO: 27)

Lista de secuencias

- 10 <110> Metabolix, Inc.
- 10 <120> COMPOSICIONES DE COPOLÍMERO DE POLIHIDROXIALCANOATO Y MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE LAS MISMAS
- 15 <130> MBLX-50416WO
- 15 <150> Documento US 61/734489
<151> 07-12-2012
- 20 <150> Documento US 61/711825
<151> 10-10-2012
- <160> 27
- 25 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> promotor PsynA
- 35 <400> 1
ttgacagcta gctcagtcct aggtataatg ctagc 35
- <210> 2
<211> 35
<212> ADN
- 40 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> promotor PsynC
- 45 <400> 2
ttgacagcta gctcagtcct aggtactgtg ctagc 35
- <210> 3
<211> 35
<212> ADN
- 50 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> promotor PsynCE

ES 2 747 230 T3

	<400> 3 tttacagcta gctcagtcct aggtattatg ctagc	35
5	<210> 4 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> promotor PsynH	
15	<400> 4 ctgacagcta gctcagtcct aggtataatg ctagc	35
20	<210> 5 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> promotor PsynK	
30	<400> 5 tttacggcta gctcagtcct aggtacaatg ctagc	35
35	<210> 6 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> PsynM promotor	
45	<400> 6 ttgacagcta gctcagtcct agggactatg ctagc	35
50	<210> 7 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> promotor Px	
60	<400> 7 tcgccagtct ggccctgaaca tgatataaaa t	31
65	<210> 8 <211> 178 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> promotor PuspA	
75	<400> 8 aaccactatc aatatattca tgtcgaaaat ttgtttatct aacgagtaag caaggcggat	60
80	tgacgggatca tccgggtcgc tataaggtaa ggatgggtctt aacactgaat ccttacggct	120
85	gggttagccc cgcgcacgta gttcgcagga cgcggggtgac gtaacggcac aagaaacg	178
90	<210> 9 <211> 170	

ES 2 747 230 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> promotor PrpsU

<400> 9
 atg**cg**gggttg atgtaaaact ttgttcgccc ctggagaaag cctcgtgtat actcctcacc 60
 cttataaaaag tccctttcaa aaaaggccgc ggtgctttac aaagcagcag caattgcagt 120
 aaaattccgc accattttga aataagctgg cgttgatgcc agcggcaaac 170

10 <210> 10
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> promotor PsynAF7

<400> 10
 ttgacagcta gctcagctct aggtacagtg ctagc 35

20 <210> 11
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> promotor PsynAF3

<400> 11
 30 ttgacagcta gctcagctct aggtacaatg ctagc 35

<210> 12
 <211> 29
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> terminador TtrpL

40 <400> 12
 ctaatgagcg ggctttttt tgaacaaaa 29

<210> 13
 <211> 38
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> terminador T1006

50 <400> 13
 aaaaaaaaa aaccccgctt cggcgggggt ttttttt 38

<210> 14
 <211> 44
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 60 <223> terminador TrrnB1

ES 2 747 230 T3

	<400> 14 ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gcctttcggt ttat	44
5	<210> 15 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> terminador TrnB2	
	<400> 15 agaaggccat cctgacggat ggcctttt	28
15	<210> 16 <211> 1362 <212> ADN <213> <i>Clostridium kluyveri</i>	
20	<400> 16 atgtccaacg aggttagcat taaggagctg attgagaagg cgaaagtggc gcagaaaaag	60
	ctggaagcgt atagccaaga gcaagttgac gttctggtca aggcgctggg taaagttgtg	120
	tacgacaacg ccgagatggt cgcgaaagag gcggtggagg aaaccgagat ggggtgtttac	180
	gaggataaag tggctaaatg tcatctgaaa tctggtgcaa tctggaatca cattaagat	240
	aagaaaaccg ttggtattat caaggaagaa ccggagcgtg cgctggtgta cgtcgcgaag	300
	cctaaagggtg ttgtggcggc gacgaccct atcaccaatc ctgtggttac cccgatgtgt	360
	aacgcgatgg cagcaattaa aggtcgcaac accatcattg tcgccccgca tccgaaggcg	420
	aagaagggtga gcgcgcacac cgtggagctg atgaatgcag aactgaaaaa gttgggtgcg	480
	ccggaaaaaca ttatccagat cgttgaagcc ccaagccgtg aagcagccaa ggagttgatg	540
	gagagcgcag acgtggttat cgccacgggt ggcgcaggcc gtgttaaagc agcgtactcc	600
	tccggccgtc cggcatacgg tgtcgggtccg ggcaattctc aggtcattgt cgataagggt	660
	tacgattata acaaagctgc ccaggacatc attaccggcc gcaagtatga caacggtatc	720
	atttgcagct ctgagcagag cgtgatcgca ccggcggagg actacgacaa ggtcatcgcg	780
	gctttcgtcg agaatggcgc gttctatgtc gaggatgagg aaactgtgga gaaattccgt	840
	agcacgctgt tcaaggatgg caagatcaat agcaaaatca tcggtaaatac cgtgcagatc	900
	atcgctgacc tggctggtgt caaggtgccg gaaggcacca aggtgatcgt gttgaagggc	960
	aagggtgccg gtgaaaagga cgttctgtgc aaggagaaaa tgtgcccggt cctggttgcc	1020
	ctgaaatatg acacctttga ggaggcggtc gagatcgca tggccaacta tatgtacgag	1080
	gggtgcgggccc ataccgccgg tatccacagc gataacgacg agaatatccg ctacgcgggt	1140
	acggtgctgc caatcagccg tctggttgtc aaccagccag caactacggc cgggtggtagc	1200

ES 2 747 230 T3

tttaacaatg gttttaatcc gaccaccacc ttgggctgcg gtagctgggg ccgtaactcc 1260
 attagcgaga acctgacgta tgagcatctg attaatgtca gccgtattgg ctatttcaat 1320
 aaggaggcaa aagttcctag ctacgaggag atctgggggtt aa 1362

<210> 17
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> *Clostridium kluyveri*

5

<400> 17
 Met Ser Asn Glu Val Ser Ile Lys Glu Leu Ile Glu Lys Ala Lys Val
 1 5 10 15
 Ala Gln Lys Lys Leu Glu Ala Tyr Ser Gln Glu Gln Val Asp Val Leu
 20 25 30
 Val Lys Ala Leu Gly Lys Val Val Tyr Asp Asn Ala Glu Met Phe Ala
 35 40 45
 Lys Glu Ala Val Glu Glu Thr Glu Met Gly Val Tyr Glu Asp Lys Val
 50 55 60
 Ala Lys Cys His Leu Lys Ser Gly Ala Ile Trp Asn His Ile Lys Asp
 65 70 75 80
 Lys Lys Thr Val Gly Ile Ile Lys Glu Glu Pro Glu Arg Ala Leu Val
 85 90 95
 Tyr Val Ala Lys Pro Lys Gly Val Val Ala Ala Thr Thr Pro Ile Thr
 100 105 110
 Asn Pro Val Val Thr Pro Met Cys Asn Ala Met Ala Ala Ile Lys Gly
 115 120 125
 Arg Asn Thr Ile Ile Val Ala Pro His Pro Lys Ala Lys Lys Val Ser
 130 135 140
 Ala His Thr Val Glu Leu Met Asn Ala Glu Leu Lys Lys Leu Gly Ala
 145 150 155 160
 Pro Glu Asn Ile Ile Gln Ile Val Glu Ala Pro Ser Arg Glu Ala Ala
 165 170 175
 Lys Glu Leu Met Glu Ser Ala Asp Val Val Ile Ala Thr Gly Gly Ala
 180 185 190

ES 2 747 230 T3

Gly Arg Val Lys Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Arg Pro Ala Tyr Gly Val
 195 200 205

Gly Pro Gly Asn Ser Gln Val Ile Val Asp Lys Gly Tyr Asp Tyr Asn
 210 215 220

Lys Ala Ala Gln Asp Ile Ile Thr Gly Arg Lys Tyr Asp Asn Gly Ile
 225 230 235 240

Ile Cys Ser Ser Glu Gln Ser Val Ile Ala Pro Ala Glu Asp Tyr Asp
 245 250 255

Lys Val Ile Ala Ala Phe Val Glu Asn Gly Ala Phe Tyr Val Glu Asp
 260 265 270

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

Ile Asn Ser Lys Ile Ile Gly Lys Ser Val Gln Ile Ile Ala Asp Leu
 290 295 300

Ala Gly Val Lys Val Pro Glu Gly Thr Lys Val Ile Val Leu Lys Gly
 305 310 315 320

Lys Gly Ala Gly Glu Lys Asp Val Leu Cys Lys Glu Lys Met Cys Pro
 325 330 335

Val Leu Val Ala Leu Lys Tyr Asp Thr Phe Glu Glu Ala Val Glu Ile
 340 345 350

Ala Met Ala Asn Tyr Met Tyr Glu Gly Ala Gly His Thr Ala Gly Ile
 355 360 365

His Ser Asp Asn Asp Glu Asn Ile Arg Tyr Ala Gly Thr Val Leu Pro
 370 375 380

Ile Ser Arg Leu Val Val Asn Gln Pro Ala Thr Thr Ala Gly Gly Ser
 385 390 395 400

Phe Asn Asn Gly Phe Asn Pro Thr Thr Thr Leu Gly Cys Gly Ser Trp
 405 410 415

Gly Arg Asn Ser Ile Ser Glu Asn Leu Thr Tyr Glu His Leu Ile Asn
 420 425 430

Val Ser Arg Ile Gly Tyr Phe Asn Lys Glu Ala Lys Val Pro Ser Tyr
 435 440 445

Glu Glu Ile Trp Gly
 450

ES 2 747 230 T3

<210> 18
 <211> 870
 <212> ADN

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 18
 atggaagtag gttttctggg tctgggcatt atgggtaaag ctatgtccat gaacctgctg 60
 aaaaacgggt tcaaagttac cgtgtggaac cgcactctgt ctaaagtga tgaactgggt 120
 gaacacggtg caagcgtgtg cgagtctccg gctgaggtga tcaagaaatg caaatacacg 180
 atcgcgatgc tgagcgatcc gtgtgcagct ctgtctgttg ttttcgataa aggcgggtgtt 240
 ctggaacaga tctgcgaggg taagggctac atcgacatgt ctaccgtcga cgcggaaact 300
 agcctgaaaa ttaacgaagc gatcacgggc aaaggtggcc gttttgtaga aggtcctgtt 360
 agcggttcca aaaagccggc agaagacggc cagctgatca tcctggcagc aggcgacaaa 420
 gcactgttcg aggaatccat cccggccttt gatgtactgg gcaaacgttc cttttatctg 480
 ggtcaggtgg gtaacgggtg gaaaatgaaa ctgattgtta acatgatcat gggttctatg 540
 atgaacgcgt ttagcgaagg tctggtactg gcagataaaa gcggtctgtc tagcgacacg 600
 ctgctggata ttctggatct gggtgctatg acgaatccga tgttcaaagg caaagggtccg 660
 tccatgacta aatccagcta cccaccggct ttcccgtga aacaccagca gaaagacatg 720
 cgtctggctc tggctctggg cgacgaaaac gctgttagca tgccggtcgc tgcggctgcg 780
 aacgaagcct tcaagaaagc ccgtagcctg ggccctgggcg atctggactt ttctgctgtt 840
 atcgaagcgg taaaattctc tcgtgaataa 870

10 <210> 19
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*

15 <400> 19
 Met Glu Val Gly Phe Leu Gly Leu Gly Ile Met Gly Lys Ala Met Ser
 1 5 10 15
 Met Asn Leu Leu Lys Asn Gly Phe Lys Val Thr Val Trp Asn Arg Thr
 20 25 30
 Leu Ser Lys Cys Asp Glu Leu Val Glu His Gly Ala Ser Val Cys Glu
 35 40 45
 Ser Pro Ala Glu Val Ile Lys Lys Cys Lys Tyr Thr Ile Ala Met Leu
 50 55 60

ES 2 747 230 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Leu Ala Leu Ala Leu Gly Asp Glu Asn Ala Val Ser Met Pro Val
245 250 255

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

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

Glu

<210> 20
<211> 1152
5 <212> ADN
<213> *Escherichia coli*

ES 2 747 230 T3

<400> 20
atgatggcta acagaatgct ggtgaacgaa acggcatggt ttggtcgggg tgctgttggg 60
gctttaaccg atgaggtgaa acgccgtggt tatcagaagg cgctgatcgt caccgataaa 120
acgctggtgc aatgcggcgt ggtggcgaaa gtgaccgata agatggatgc tgcagggctg 180
gcatggggcga tttacgacgg cgtagtgcc aaccaacaa ttactgtcgt caaagaaggg 240
ctcgggtgat tccagaatag cggcgcggat tacctgatcg ctattggtgg tggttctcca 300
caggataactt gtaaagcgat tggcattatc agcaacaacc cggagtttgc cgatgtgcgt 360
agcctggaag ggctttcccc gaccaataaa cccagtgtac cgattctggc aattcctacc 420
acagcaggta ctgcggcaga agtgaccatt aactacgtga tcaactgacga agagaaacgg 480
cgcaagtttg tttgcggtga tccgcatgat atcccgcagg tggcgtttat tgacgctgac 540
atgatggatg gtatgcctcc agcgtgaaa gctgcgacgg gtgtcgatgc gctcaactcat 600
gctattgagg ggtatattac ccgtggcgcg tggcgctaa ccgatgcact gcacattaa 660
gcgattgaaa tcattgctgg ggcgctgcga ggatcggttg ctggtgataa ggatgccgga 720
gaagaaatgg cgctcgggca gtatggtgcg ggtatgggct tctcgaatgt tgggttaggg 780
ttggtgcatg gtatggcgca tccactgggc gcgttttata aactccaca cgggtgtgcg 840
aacgccatcc tgttaccgca tgtcatgcgt tataacgctg actttaccgg tgagaagtac 900
cgcgatatcg cgcgcgttat gggcgtgaaa gtggaaggta tgagcctgga agaggcgcgt 960
aatgccgctg ttgaagcggg gtttgctctc aaccgtgatg tcggtattcc gccacatttg 1020
cgtgatggtg gtgtacgcaa ggaagacatt ccggcactgg cgcaggcggc actggatgat 1080
gtttgtaccg gtggcaaccc gcgtgaagca acgcttgagg atattgtaga gctttaccat 1140
accgcctggt aa 1152

5 <210> 21
<211> 382
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

10 <400> 21
Met Ala Asn Arg Met Leu Val Asn Glu Thr Ala Trp Phe Gly Arg Gly
1 5 10 15
Ala Val Gly Ala Leu Thr Asp Glu Val Lys Arg Arg Gly Tyr Gln Lys
20 25 30
Ala Leu Ile Val Thr Asp Lys Thr Leu Val Gln Cys Gly Val Val Ala
35 40 45

ES 2 747 230 T3

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

ES 2 747 230 T3

290		295		300
Val Met Gly Val Lys Val Glu Gly Met Ser Leu Glu Glu Ala Arg Asn				
305		310		315 320
Ala Ala Val Glu Ala Val Phe Ala Leu Asn Arg Asp Val Gly Ile Pro				
		325		330 335
Pro His Leu Arg Asp Val Gly Val Arg Lys Glu Asp Ile Pro Ala Leu				
		340		345 350
Ala Gln Ala Ala Leu Asp Asp Val Cys Thr Gly Gly Asn Pro Arg Glu				
		355		360 365
Ala Thr Leu Glu Asp Ile Val Glu Leu Tyr His Thr Ala Trp				
		370		375 380

<210> 22
 <211> 1680
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> fusión phaC3/C5

10

<400> 22
 atgagtaaca agaacaacga tgagctgcag tggcaatcct ggttcagcaa ggcgcccacc 60
 accgagggcga acccgatggc caccatggtg caggatatcg gcggtgcgct caaaccggaa 120
 gcgatggagc agctgaaaaa cgattatctg cgtgacttca ccgcggtgtg gcaggatattt 180
 ttggctggca aggcgccagc cgtcagcgac cgccgcttca gctcggcagc ctggcagggc 240
 aatccgatgt cggccttcaa tgccgcatct tacctgctca acgccaatt cctcagtgcc 300
 atggtggagg cggtggacac cgcacccag caaaagcaga aaatacgctt tgccgtgcag 360
 caggtgattg atgcatgct gcccggaac ttctctcgca ccaaccggga agcgcagcaa 420
 aaactgattg aaaccaagg cgagagcctg acgcgtggcc tggccaatat gctgggagat 480
 atcaacaagg gccatatctc gctgtcggac gaatcggcct ttgaagtggg ccgcaacctg 540
 gccattacc cgggcaccgt gatttacgaa aatccgctgt tccagctgat ccagtacacg 600
 ccgaccacgc cgacggtcag ccagcggccg ctggtgatgg tgccgcccgtg catcaacaag 660
 ttctacatcc tcgacctgca accggaaaat tcgctgggtg gctacgcggt ggagcagggc 720
 aacaccgtgt tcctgatctc gtggagcaat ccggacaagt cgctggccgg caccacctgg 780
 gacgactacg tggagcagg cgatgatcga gcgatccgca tcgtccagga cgtcagcggc 840
 caggacaagc tgaacatggt cggcttctgc gtgggcccga ccatcgttgc caccgcaactg 900
 gcggtactgg cggcgcgtgg ccagcaccgc gcggccagcc tgaccctgct gaccaccttc 960

ES 2 747 230 T3

ctcgacttca gcgacaccgg cgtgctcgac gtcttcgctg atgaaacca ggtcgcgctg 1020
 cgtgaacagc aattgcgcga tggcggcctg atgccgggcc gtgacctggc ctcgaccttc 1080
 tcgagcctgc gtccgaacga cctggtatgg aactatgtgc agtcgaacta cctcaaaggc 1140
 aatgagccgg cggcgtttga cctgctgttc tgggaattcgg acagcaccaa tttgccgggc 1200
 ccgatgttct gctggtacct gcgcaacacc tacctggaaa acagcctgaa agtgccgggc 1260
 aagctgacgg tggccggcga aaagatcgac ctccggcctga tcgacgcccc ggccttcatac 1320
 tacggttcgc gcgaagacca catcgtgccg tggatgtcgg cgtacggttc gctcgacatac 1380
 ctcaaccagg gcaagccggg cgccaaccgc ttcgtgctgg gcgcgtccgg ccatatcgcc 1440
 ggcgtgatca actcgggtggc caagaacaag cgcagctact ggatcaacga cgggtggcgcc 1500
 gccgatgccc aggcctgggt cgatggcgcg caggaagtgc cgggcagctg gtggccgcaa 1560
 tgggcccgggt tcctgacca gcatggcggc aagaaggta agcccaaggc caagcccggc 1620
 aacgcccgct acaccgcat cgaggcggcg cccggccggt acgtcaaagc caagggctga 1680

<210> 23
 <211> 559
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> fusión PhaC3/C5

<400> 23
 Met Ser Asn Lys Asn Asn Asp Glu Leu Gln Trp Gln Ser Trp Phe Ser
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

ES 2 747 230 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 747 230 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 24
<211> 1821
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> fusión phaC3/C1

10

<400> 24
atgactagaa ggaggtttca tatgagtaac aagaacaacg atgagctggc gacgggtaaa 60

gggtgctgctg catcttctac tgaaggtaaa tctcagccgt ttaaattccc accgggtccg 120

ES 2 747 230 T3

ctggaccccg ccacttggct ggaatggagc cgtcagtggc aaggtccgga gggcaatggc 180
 ggtaccgtgc cgggtggctt tccgggtttc gaagcgttcg cggcgtcccc gctggcgggc 240
 gtgaaaatcg acccggctca gctggcagag atccagcagc gttatatgcg tgatttcacc 300
 gagctgtggc gtggtctggc aggcgggtgac accgagagcg ctggcaaact gcatgaccgt 360
 cgcttcgcgt ccgaagcgtg gcacaaaaac gcgccgtatc gctataactgc ggcattttac 420
 ctgctgaacg cacgtgcact gacggaactg gctgatgcag tagaagcggga tccgaaaacc 480
 cgtcagcgtg tccgttttgc ggtttccag tgggtagatg ctatgagccc ggctaacttc 540
 ctggccacca acccggacgc tcagaaccgt ctgatcgaga gccgtggtga aagcctgcgt 600
 gccggcatgc gcaatatgct ggaagatctg acccgcggta aaatttccca aaccgatgag 660
 actgccttcg aagtaggccg taacatggca gttaccgaag gtgctgtggt attcgaaaac 720
 gagttcctcc agctgctgca gtacaaacct ctgactgaca aagtatacac ccgtccgctg 780
 ctgctggtac cgccgtgcat taacaagttc tatattctgg acctgcagcc ggaaggttct 840
 ctggtccggt acgcagtcga acagggtcac actgtattcc tggtgagctg ggcgaatcca 900
 gacgctagca tggctggctg tacctgggat gactatattg aaaacgcggc tatccgcgcc 960
 atcgaggttg tgcgtgatat cagcggtcag gacaagatca acaccctggg cttttgtggt 1020
 ggtggcacga tcactctccac tgccctggcg gtcctggccg cccgtggtga gcacccgggtg 1080
 gcctctctga ccctgctgac taccctgctg gacttcaccg atactggtat cctggatggt 1140
 ttcgtggacg agccacacgt tcagctgcgt gaggcgactc tgggcggcgc cagcggcgggt 1200
 ctgctgcgtg gtgtcgagct ggccaatacc ttttccttcc tgcgcccga aogacctggtt 1260
 tggaaactacg ttgttgacaa ctatctgaaa ggcaacaccc cggtagcttt cgatctgctg 1320
 ttctggaacg gtgatgcaac caacctgcct ggtccatggt actggtggtg cctgcgtcat 1380
 acttacctgc agaacgaact gaaagagccg ggcaaactga ccgtgtgtaa cgaacctgtg 1440
 gacctgggcg cgattaacgt tcctacttac atctacggtt cccgtgaaga tcacatcgta 1500
 ccgtggaccg cggcttacgc cagcaccgcg ctgctgaaga acgatctgcg tttcgtactg 1560
 ggcgcacatcc gccatatcgc aggtgtgatc aaccctcctg caaagaaaaa gcgttctcat 1620
 tggaccaacg acgcgctgcc agaatccgcg caggattggc tggcaggtgc tgaggaacac 1680
 catggttctt ggtggccgga ttggatgacc tggctgggta aacaagccgg tgcaaaacgt 1740
 gcagctccaa ctgaatatgg tagcaagcgt tatgctgcaa tccagccagc gccaggccgt 1800
 tacgttaaag cgaaagcata a 1821

<210> 25
 <211> 599
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

ES 2 747 230 T3

<220>

<223> fusión PhaC3/C1

5

<400> 25

Met Ser Asn Lys Asn Asn Asp Glu Leu Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Ser Ser Thr Glu Gly Lys Ser Gln Pro Phe Lys Phe Pro Pro Gly
 20 25 30

Pro Leu Asp Pro Ala Thr Trp Leu Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly
 35 40 45

Pro Glu Gly Asn Gly Gly Thr Val Pro Gly Gly Phe Pro Gly Phe Glu
 50 55 60

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

Leu Ala Glu Ile Gln Gln Arg Tyr Met Arg Asp Phe Thr Glu Leu Trp
 85 90 95

Arg Gly Leu Ala Gly Gly Asp Thr Glu Ser Ala Gly Lys Leu His Asp
 100 105 110

Arg Arg Phe Ala Ser Glu Ala Trp His Lys Asn Ala Pro Tyr Arg Tyr
 115 120 125

Thr Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr Glu Leu Ala
 130 135 140

Asp Ala Val Glu Ala Asp Pro Lys Thr Arg Gln Arg Ile Arg Phe Ala
 145 150 155 160

Val Ser Gln Trp Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe Leu Ala Thr
 165 170 175

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

Arg Ala Gly Met Arg Asn Met Leu Glu Asp Leu Thr Arg Gly Lys Ile
 195 200 205

Ser Gln Thr Asp Glu Thr Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn Met Ala Val
 210 215 220

Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn Glu Phe Phe Gln Leu Leu Gln

ES 2 747 230 T3

225						230															235													240		
Tyr	Lys	Pro	Leu	Thr	Asp	Lys	Val	Tyr	Thr	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Val																					
				245					250						255																					
Pro	Pro	Cys	Ile	Asn	Lys	Phe	Tyr	Ile	Leu	Asp	Leu	Gln	Pro	Glu	Gly																					
			260					265						270																						
Ser	Leu	Val	Arg	Tyr	Ala	Val	Glu	Gln	Gly	His	Thr	Val	Phe	Leu	Val																					
		275					280					285																								
Ser	Trp	Arg	Asn	Pro	Asp	Ala	Ser	Met	Ala	Gly	Cys	Thr	Trp	Asp	Asp																					
	290					295					300																									
Tyr	Ile	Glu	Asn	Ala	Ala	Ile	Arg	Ala	Ile	Glu	Val	Val	Arg	Asp	Ile																					
305					310					315																										
Ser	Gly	Gln	Asp	Lys	Ile	Asn	Thr	Leu	Gly	Phe	Cys	Val	Gly	Gly	Thr																					
				325					330																											
Ile	Ile	Ser	Thr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	Arg	Gly	Glu	His	Pro																					
			340					345						350																						
Val	Ala	Ser	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Asp	Phe	Thr	Asp	Thr																					
		355					360					365																								
Gly	Ile	Leu	Asp	Val	Phe	Val	Asp	Glu	Pro	His	Val	Gln	Leu	Arg	Glu																					
370						375					380																									
Ala	Thr	Leu	Gly	Gly	Ala	Ser	Gly	Gly	Leu	Leu	Arg	Gly	Val	Glu	Leu																					
385					390						395																									
Ala	Asn	Thr	Phe	Ser	Phe	Leu	Arg	Pro	Asn	Asp	Leu	Val	Trp	Asn	Tyr																					
				405					410																											
Val	Val	Asp	Asn	Tyr	Leu	Lys	Gly	Asn	Thr	Pro	Val	Pro	Phe	Asp	Leu																					
			420					425					430																							
Leu	Phe	Trp	Asn	Gly	Asp	Ala	Thr	Asn	Leu	Pro	Gly	Pro	Trp	Tyr	Cys																					
		435					440					445																								
Trp	Tyr	Leu	Arg	His	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asn	Glu	Leu	Lys	Glu	Pro	Gly																					
	450					455					460																									
Lys	Leu	Thr	Val	Cys	Asn	Glu	Pro	Val	Asp	Leu	Gly	Ala	Ile	Asn	Val																					
465					470					475					480																					

ES 2 747 230 T3

Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp His Ile Val Pro Trp Thr
 485 490 495

Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Lys Asn Asp Leu Arg Phe Val
 500 505 510

Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys
 515 520 525

Lys Lys Arg Ser His Trp Thr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ser Ala Gln
 530 535 540

Asp Trp Leu Ala Gly Ala Glu Glu His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp
 545 550 555 560

Trp Met Thr Trp Leu Gly Lys Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro
 565 570 575

Thr Glu Tyr Gly Ser Lys Arg Tyr Ala Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly
 580 585 590

Arg Tyr Val Lys Ala Lys Ala
 595

<210> 26
 <211> 1920
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> fusión phaC3/C33

10 <400> 26
 atgagtaaca agaacaacga tgagctggcg aatttcgacc cgctggctgg cctgtctggt 60
 caatcggtgc aacagttctg gaatgagcag tggagccgta ccctgcagac cttgcagcag 120
 atgggtcaac cgggcctgcc gggcattcaa ggtatgccgg gtatgccaga catggcacia 180
 gcgtggaaaag ccgctgtgcc ggaaccgggt gcactgcctg agaatgcgct gtctctggat 240
 ccggagaagc tgctggaact gcagcgtcaa tatctggacg gtgcaaaaagc gatggcagag 300
 cagggcggtg cgcaagcatt gctggcaaaa gataaacggt tcaataccga atcgtgggca 360
 ggtaatccgc tgacggctgc gaccgaggca acctacctgc tgaactcccg tatgctgatg 420
 ggtctggcgg acgctgttca ggcggacgat aagaccgta accgtgtgcg ttttgcgatt 480
 gagcagtggc tggcagcgtg ggcgccgagc aacttcctgg cgctgaatgc tgaggcccaa 540
 aagaaggcga tcgagactca ggcgagagc ctggccaag gcgtggcgaa cctgctggcg 600
 gatatgcgtc agggtcatgt ctccatgacc gacgaaagcc tgtttacggt gggcaagaac 660

ES 2 747 230 T3

gtggcaacga ccgaaggtgc ggttgtttc gagaatgagc tgttccagtt gattgagtat 720
aagccgttga cggataaggt gcatgagcgc ccgttcctga tggtgccgcc gtgcatcaac 780
aaattctata tcctggatct gcaaccggac aacagcctga tccgttatgc cgtagccag 840
ggccatcgca cgttcgtcat gtcctggcgc aatccagacg aatctctggc ccgtaaaacg 900
tgggataact acatcgaaga tggcgttctg acgggtattc gcgtcgcgcg tgagattgct 960
ggtgcggagc agatcaacgt tctgggtttt tgtgtgggcg gcactatgtt gagcaccgcg 1020
ttggcggttc tgcaagcccg ccacgaccgc gagcacggcg cagtcgcagc accagccgct 1080
aaagcgccag cggcgaaacg tgcggcaggt agccgcagcg cggctcgtac gtccactgcg 1140
cgtgccaccg cccctgcagg tgttccgttc ccggttgcca gcgtcacctt gctgaccacc 1200
tttatcgatt tctccgacac cggcatcctg gacgtgttca ttgatgaatc tgtcgtccgt 1260
tttcgcgaga tgcaaatggg tgaaggtggt ttgatgaagg gccaaagacct ggcgagcacc 1320
tttagctttc tgcgcccga tgacttggtt tgggaattacg tcgtgggcaa ctacctgaaa 1380
ggtgaaaccc ctccgccgtt tgacctgctg tattggaaca gcgatagcac caacctgccg 1440
ggtccgtact acgcgtggta cctgcgtaat ctgtacctgg aaaatcgctt ggcacagccg 1500
ggtgcgttga ctgtttgctg tgaacgtatc gacatgcacc agctgcgtct gccggcgtac 1560
atctatggca gccgcaaga tcacattggt ccggttggtg gtagctatgc cagcacccaa 1620
gtgctgggtg gtgataagcg ctttgtgatg ggtgcgtccg gtcacattgc aggcgtcatc 1680
aaccgcctg caaagaagaa acgtagctac tggctgcgtg aagatggcca gctgccggcc 1740
acgctgaaag agtggcaggc cggtgccgac gagtatcctg gtagctggtg ggcggattgg 1800
agcccgtggc tggccgagca cggtggcaaa ctggtggcag cgccgaagca atacggcaaa 1860
ggccgtgagt acacggcgat tgaaccggct ccaggccgct acgttttggg caaggcgtaa 1920

<210> 27
<211> 639
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> fusión PhaC3/C33

<400> 27
Met Ser Asn Lys Asn Asn Asp Glu Leu Ala Asn Phe Asp Pro Leu Ala
1 5 10 15

Gly Leu Ser Gly Gln Ser Val Gln Gln Phe Trp Asn Glu Gln Trp Ser
20 25 30

Arg Thr Leu Gln Thr Leu Gln Gln Met Gly Gln Pro Gly Leu Pro Gly
35 40 45

ES 2 747 230 T3

Ile Gln Gly Met Pro Gly Met Pro Asp Met Ala Gln Ala Trp Lys Ala
50 55 60

Ala Val Pro Glu Pro Gly Ala Leu Pro Glu Asn Ala Leu Ser Leu Asp
65 70 75 80

Pro Glu Lys Leu Leu Glu Leu Gln Arg Gln Tyr Leu Asp Gly Ala Lys
85 90 95

Ala Met Ala Glu Gln Gly Gly Ala Gln Ala Leu Leu Ala Lys Asp Lys
100 105 110

Arg Phe Asn Thr Glu Ser Trp Ala Gly Asn Pro Leu Thr Ala Ala Thr
115 120 125

Ala Ala Thr Tyr Leu Leu Asn Ser Arg Met Leu Met Gly Leu Ala Asp
130 135 140

Ala Val Gln Ala Asp Asp Lys Thr Arg Asn Arg Val Arg Phe Ala Ile
145 150 155 160

Glu Gln Trp Leu Ala Ala Met Ala Pro Ser Asn Phe Leu Ala Leu Asn
165 170 175

Ala Glu Ala Gln Lys Lys Ala Ile Glu Thr Gln Gly Glu Ser Leu Ala
180 185 190

Gln Gly Val Ala Asn Leu Leu Ala Asp Met Arg Gln Gly His Val Ser
195 200 205

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

Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn Glu Leu Phe Gln Leu Ile Glu Tyr
225 230 235 240

Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val His Glu Arg Pro Phe Leu Met Val Pro
245 250 255

Pro Cys Ile Asn Lys Phe Tyr Ile Leu Asp Leu Gln Pro Asp Asn Ser
260 265 270

Leu Ile Arg Tyr Ala Val Ser Gln Gly His Arg Thr Phe Val Met Ser
275 280 285

Trp Arg Asn Pro Asp Glu Ser Leu Ala Arg Lys Thr Trp Asp Asn Tyr

ES 2 747 230 T3

290						295										300
Ile	Glu	Asp	Gly	Val	Leu	Thr	Gly	Ile	Arg	Val	Ala	Arg	Glu	Ile	Ala	
305					310					315					320	
Gly	Ala	Glu	Gln	Ile	Asn	Val	Leu	Gly	Phe	Cys	Val	Gly	Gly	Thr	Met	
				325					330					335		
Leu	Ser	Thr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Ala	Arg	His	Asp	Arg	Glu	His	
			340					345					350			
Gly	Ala	Val	Ala	Ala	Pro	Ala	Ala	Lys	Ala	Pro	Ala	Ala	Lys	Arg	Ala	
		355					360					365				
Ala	Gly	Ser	Arg	Ser	Ala	Ala	Arg	Thr	Ser	Thr	Ala	Arg	Ala	Thr	Ala	
	370					375					380					
Pro	Ala	Gly	Val	Pro	Phe	Pro	Val	Ala	Ser	Val	Thr	Leu	Leu	Thr	Thr	
385					390					395					400	
Phe	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Thr	Gly	Ile	Leu	Asp	Val	Phe	Ile	Asp	Glu	
				405					410					415		
Ser	Val	Val	Arg	Phe	Arg	Glu	Met	Gln	Met	Gly	Glu	Gly	Gly	Leu	Met	
			420					425					430			
Lys	Gly	Gln	Asp	Leu	Ala	Ser	Thr	Phe	Ser	Phe	Leu	Arg	Pro	Asn	Asp	
		435					440					445				
Leu	Val	Trp	Asn	Tyr	Val	Val	Gly	Asn	Tyr	Leu	Lys	Gly	Glu	Thr	Pro	
	450					455					460					
Pro	Pro	Phe	Asp	Leu	Leu	Tyr	Trp	Asn	Ser	Asp	Ser	Thr	Asn	Leu	Pro	
465					470					475					480	
Gly	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Trp	Tyr	Leu	Arg	Asn	Leu	Tyr	Leu	Glu	Asn	Arg	
				485					490					495		
Leu	Ala	Gln	Pro	Gly	Ala	Leu	Thr	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Ile	Asp	Met	
			500					505						510		
His	Gln	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Tyr	Ile	Tyr	Gly	Ser	Arg	Glu	Asp	His	
		515					520					525				
Ile	Val	Pro	Val	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Leu	Gly	Gly	
	530					535					540					

ES 2 747 230 T3

Asp Lys Arg Phe Val Met Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val Ile
545 550 555 560

Asn Pro Pro Ala Lys Lys Lys Arg Ser Tyr Trp Leu Arg Glu Asp Gly
565 570 575

Gln Leu Pro Ala Thr Leu Lys Glu Trp Gln Ala Gly Ala Asp Glu Tyr
580 585 590

Pro Gly Ser Trp Trp Ala Asp Trp Ser Pro Trp Leu Ala Glu His Gly
595 600 605

Gly Lys Leu Val Ala Ala Pro Lys Gln Tyr Gly Lys Gly Arg Glu Tyr
610 615 620

Thr Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Leu Val Lys Ala
625 630 635

REIVINDICACIONES

1. Método de elaboración de una composición de copolímero de polihidroxicanoato que comprende una pluralidad de moléculas de copolímero de polihidroxicanoato, en el que las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato (i) comprenden monómeros de 3-hidroxi-butirato y monómeros de 4-hidroxi-butirato, (ii) tienen un porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxi-butirato del 23,5 al 75%, (iii) tienen un contenido de base biológica de $\geq 80\%$ correspondiente a la cantidad de carbono de base biológica como porcentaje en peso (masa) de carbono orgánico total tal como se define en la norma ASTM D6866-12 y (iv) tienen un peso molecular promedio en peso de 250 kDa a 2,0 MDa, y además en el que la composición tiene una temperatura de transición vítrea de -60°C a -5°C , comprendiendo el método: cultivar un organismo en presencia de uno o más materiales de partida de carbono en condiciones en las que (a) el uno o más materiales de partida de carbono se convierten en 3-hidroxi-butiril-CoA y 4-hidroxi-butiril-CoA y (b) la 3-hidroxi-butiril-CoA y la 4-hidroxi-butiril-CoA se polimerizan para formar las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato, formando de ese modo la composición, en la que:
- el organismo se ha modificado por ingeniería genética mediante la incorporación estable de genes que codifican para una polihidroxicanoato sintasa, una acetil-CoA acetiltransferasa, una acetoacetil-CoA reductasa, una succinato-semialdehído deshidrogenasa, una semialdehído succínico reductasa y una CoA transferasa en el organismo, mediante la introducción de uno o más plásmidos estables que comprenden los genes y/o mediante la integración de los genes en el genoma del organismo, para comprender actividades enzimáticas de los productos génicos y para no comprender actividades enzimáticas de o bien una succinato-semialdehído deshidrogenasa dependiente de NAD^+ o bien una succinato-semialdehído deshidrogenasa dependiente de NADP^+ o ambas, y el uno o más materiales de partida de carbono, tomados juntos, tienen un contenido de base biológica de $\geq 80\%$.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el organismo se ha modificado por ingeniería genética adicionalmente (a) para comprender actividades enzimáticas de (i) una alfa-cetoglutarato descarboxilasa o 2-oxoglutarato descarboxilasa y (ii) una L-1,2-propanodiol oxidorreductasa, y (b) para no comprender actividades enzimáticas de una o más de (i) una tioesterasa II, (ii) una acil-CoA tioesterasa I y proteasa I y lisofosfolipasa L multifuncionales, (iii) una acil-CoA tioesterasa y (iv) una aldehído deshidrogenasa.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el uno o más materiales de partida de carbono comprenden una fuente de carbono seleccionada del grupo que consiste en glucosa, levoglucosano, sacarosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa, arabinosa, y mezclas de los mismos.
4. Método según la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que el uno o más materiales de partida de carbono comprenden uno o más de melaza, almidón, un ácido graso, un aceite vegetal, un material lignocelulósico, etanol, ácido acético, glicerol, un gas de síntesis derivado de biomasa y metano que se origina a partir de un gas de vertedero.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el uno o más materiales de partida de carbono no comprenden γ -butirolactona, 1,4-butanodiol, 4-hidroxi-butirato, 3-hidroxi-butirato, α -cetoglutarato, oxaloacetato, malato, fumarato, citrato, succinato o 3-hidroxi-butirato.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el uno o más materiales de partida de carbono, tomados juntos, tienen un contenido de base biológica de $\geq 95\%$.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el porcentaje molar monomérico de monómeros de 4-hidroxi-butirato de las moléculas de copolímero de polihidroxicanoato es del 25 al 70%.

Figura 1

