



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0718974-5 B1



(22) Data do Depósito: 21/11/2007

(45) Data de Concessão: 15/12/2020

(54) Título: MÉTODO PARA PREPARAR UM COPOLÍMERO

(51) Int.Cl.: C08G 63/91; C08G 63/08.

(30) Prioridade Unionista: 21/11/2006 KR 10-2006-0115158; 21/11/2006 KR 10-2006-0115159; 21/11/2006 KR 10-2006-0115161; 21/11/2006 KR 10-2006-0115160.

(73) Titular(es): LG CHEM, LTD.; KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY.

(72) Inventor(es): SI-JAE PARK; SANG-HYUN LEE; EUN-JEONG LEE; HYE-OK KANG; TAE-WAN KIM; TAEK-HO YANG; SANG-YUP LEE.

(86) Pedido PCT: PCT KR2007005852 de 21/11/2007

(87) Publicação PCT: WO 2008/062995 de 29/05/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 20/05/2009

(57) Resumo: COPOLÍMERO, E, MÉTODO PARA PREPARAR UM COPOLÍMERO. A presente invenção refere-se a um copolímero compreendendo unidade de monômero de 4-hidroxibutirato e unidade de monômero de lactato, um copolímero de unidade de monômero de 4-hidroxibutirato, unidade de monômero de lactato e 3-hidroxialcanoato, ou seu método de preparação. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a um método para preparar um copolímero compreendendo monômero de lactato; monômero de 4-hidroxibutirato; e opcionalmente 3-hidroxialcanoato, em que o método compreende cultivar uma célula ou planta compreendendo o gene de enzima convertendo lactato e 3-hidroxialcanoato em lactil-CoA e 3-hidroxialconoil-CoA, respectivamente, gene de fostotransbutilase, gene de butirato quinase e gene poli-hidroxialcanoato sintase juntos, e o copolímero feito pelo método. O copolímero da presente invenção é um polímero biodegradável sendo capaz de ser usado de modo utilizável em vez de plástico sintético convencional, e o copolímero pode ser utilizado para uso medicinal.

“MÉTODO PARA PREPARAR UM COPOLÍMERO”

[CAMPO TÉCNICO]

[0001] A presente invenção refere-se ao copolímero compreendendo unidade de monômero de 4-hidroxibutirato e unidade de monômero de lactato ou copolímero compreendendo unidade de monômero de 4-hidroxibutirato, unidade de monômero de lactato e unidade de monômero de 3-hidroxialcanoato, e um método para fabricar este polímero.

[TÉCNICA ANTECEDENTE]

[0002] Polilactato (PLA) é um polímero biodegradável típico originado do lactato, o qual tem uma variedade de aplicações como um polímero comum ou medicinal. No momento, PLA está sendo preparado por polimerização de lactato o qual é produzido através da fermentação de microorganismos, mas somente PLA de peso molecular baixo (1000-5000 daltons) é produzido através de polimerização direta de lactato. Para sintetizar peso molecular alto (>100.000 daltons) de PLA, um método de polimerização de PLA de peso molecular baixo obtido por polimerização direta de lactato com um agente de copulação de cadeia pode ser usado. No entanto, ele tem desvantagens como que o processo para a preparação de PLA de peso molecular alto é complicado devido à adição de um solvente ou um agente de copulação de cadeia, e também não é fácil removê-lo. No momento, o processo para a preparação de PLA comercialmente disponível de peso molecular alto, um método, no qual lactato é convertido em lactídeo para sintetizar PLA por ciclo desidratação do anel láctico, está sendo usado.

[0003] Entretanto, poli-hidroxialcanoato (PHA) é um poliéster cujos microorganismos se acumulam no mesmo como um carbono e um composto de armazenamento de energia quando outros elementos nutritivos, por exemplo, fósforo, nitrogênio, magnésio, oxigênio, são deficientes enquanto a fonte de carbono está em excesso. PHA é reconhecido como um material alternativo para plásticos sintetizados porque ele tem propriedades similares

aos polímeros sintéticos originados do petróleo, e, no mesmo tempo, mostra uma excelente propriedade biodegradável.

[0004] O existente PHA é dividido entre SCL-PHA (PHA de comprimento de cadeia curto) tendo cadeias de carbono curtas e MCL-PHA (PHA de comprimento de cadeia médio) tendo cadeias de carbono longas. Um gene sintetizando PHA foi clonado a partir de *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas* sp. Microorganismo, e PHA consistindo em vários monômeros foram sintetizados por recombinação de microorganismos (Qi et al., FEMS Microbiol. Lett., 157:155, 1997; Qi et al., FEMS Microbiol. Lett., 167:89, 1998; Langenbach et al., FEMS Microbiol. Lett., 150:303, 1997; WO 01/55436; US 6.143.952; WO 98/54329; e WO 99/61624).

[0005] Para produzir PHA em microorganismos, uma enzima que converte metabólitos de microorganismos em um monômero de PHA e PHA sintase que sintetiza um polímero de PHA usando os monômeros de PHA são requeridos. PHA sintase sintetiza PHA usando hidroxiaçil-CoA como um substrato e alfa-cetotiolase (PhaA), acetoacetil-CoA redutase (PhaB), clonada a partir de *Ralstonia eutropha* etc., 3-hidroxidecanoil-ACP:CoA transferase (PhaG) clonada a partir de *Pseudomonas* sp., (R)-específica enoil-CoA hidratase (PhaJ) derivada de *Aeromonas caviae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Fukui et al., J. Bacteriol., 180:667, 1998; Tsage et al., FEMS Microbiol. Lett., 184:193, 2000), 3-cetoacil-ACP redutase (PhaB) derivada de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc. (Taguchi et al., FEMS Microbiol. Lett., 176:183, 1999; Ren et al., J. Bacteriol., 182:2978, 2000; Park et al., FEMS Microbiol. Lett., 214:217, 2002), fosfotransbutilase (Ptb) e butirato quinase (Buk) derivada de *Clostridium acetobutyricum* (Liu e Steinbuchel, Appl Environ Microbiol, 66:739, 2000), Cat2 derivada de *Clostridium kluyveri* (Hein et al. FEMS Microbiol. Lett., 15:411, 1997), etc. são conhecidas como enzimas capazes de gerar hidroxiaçil-CoA que é um substrato de PHA. Vários tipos de PHAs foram sintetizados com essas enzimas usando

hidroxialcanoatos hidroxilados em várias posições na cadeia de carbono (principalmente as posições 3, 4, 5, e 6).

[0006] No entanto, relatou-se que se tem uma pequena atividade de PHA sintase em hidroxialcanoato que é hidroxilado na posição 2 (Zhang et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 56:131, 2001; Valentin e Steinbuchel, Appl. Microbiol. Biotechnol., 40:699, 1994). Até agora, foram elaborados relatos de atividade de PHA sintase em lactil-CoA medida in vitro, mas atividade de PHA sintase em lactil-CoA é muito fraca (Zhang et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 56:131, 2001; Valentin e Steinbuchel, Appl. Microbiol. Biotechnol., 40:699, 1994). Isto é, não existem exemplos de produção natural ou produção por células recombinantes de PHA e seus copolímeros devido um hidroalcanoato, como lactato hidroxilado na posição 2 de carbono, não é um substrato adequado para PHA sintase.

[0007] Publicação de pedido de patente U.S no. 20040076982 descreve um método em que lactato é feito a partir de glicose, e lactil-CoA é biossintetizado a partir de lactato, e 3-hidroxialcanoato-CoA é biossintetizado a partir de lactil-CoA. No entanto, a publicação não descreve um método para preparar copolímero com lactil-CoA e 3-hidroxialcanoato-CoA.

[DESCRIÇÃO]

[PROBLEMA TÉCNICO]

[0008] Consequentemente, o objeto da presente invenção é prover um copolímero compreendendo unidade de monômero de 4-hidroxibutirato e unidade de monômero de lactato ou um copolímero compreendendo unidade de monômero de 4-hidroxibutirato, unidade de monômero de lactato e unidade de monômero de 3-hidroxialcanoato.

[0009] Outro objeto da presente invenção é prover um método para preparar o copolímero.

[SOLUÇÃO TÉCNICA]

[00010] Para alcançar o objeto, a presente invenção provê um

copolímero compreendendo unidade de monômero de lactato e unidade de monômero de 4-hidroxibutirato.

[00011] A presente invenção também provê um copolímero compreendendo unidade de monômero de lactato, monômero de 4-hidroxibutirato e unidade de monômero de 3-hidroxiálcanoato.

[00012] Mais preferivelmente, o copolímero de acordo com a presente invenção é copolímero de 4-hidroxibutirato-lactato (poli(4-hidroxibutirato-co-lactato)), terpolímero de 4-hidroxibutirato-3-hidroxipropionato-lactato (poli(4-hidroxibutirato-co-3-hidroxipropionato-co-lactato)), terpolímero de 3-hidroxibutirato-4-hidroxibutirato-lactato (poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato-co-lactato)), ou tetrapolímero de 3-hidroxibutirato-3-hidroxipropionato-4-hidroxibutirato-lactato (poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxipropionato-co-4-hidroxibutirato-co-lactato)).

[00013] A presente invenção também provê um método para preparar um copolímero compreendendo unidade de monômero de lactato e unidade de monômero de 4-hidroxibutirato, em que o método compreende cultivar uma célula ou planta compreendendo (a) um gene de enzima convertendo lactato em lactil-CoA e convertendo 3-hidroxiálcanoato em 3-hidroxiálconoil-CoA, (b) gene de fosfotransbutilase, (c) gene de butirato quinase e (d) gene de poli-hidroxiálcanoato sintase (PHA) juntos.

[00014] Na presente invenção, a célula ou planta pode ser obtidas transformando uma célula ou planta não tendo pelo menos um dentre os genes (a), (b), (c) e (d) com o(s) gene(s) que a célula ou planta não têm dentre os genes (a), (b), (c) e (d). A célula ou planta pode ser obtida também transformando uma célula ou planta em que a expressão de pelo menos um dentre os genes (a), (b), (c) e (d) é fraca ou não presente com o(s) gene(s) cuja expressão é fraca ou não presente.

[00015] Isto é, a célula ou planta sendo capaz de sintetizar o copolímero compreendendo unidade de monômero de 4-hidroxibutirato e

unidade de monômero de lactato pode ser obtida (i) transformando a célula ou planta não tendo qualquer um dos genes com gene de enzima convertendo lactato e 3-hidroxiacanoato em lactil-CoA e 3-hidroxiacetoil-CoA, respectivamente, gene de fosfotransbutilase, gene de butirato quinase e gene de PHA sintase, (ii) transformando a célula ou planta tendo o gene de PHA sintase usando lactil-CoA com um substrato com gene de enzima convertendo lactato e 3-hidroxiacanoato em lactil-CoA e 3-hidroxiacetoil-CoA, respectivamente, gene de fosfotransbutilase e gene de butirato quinase, (iii) transformando a célula ou planta tendo gene de enzima convertendo lactato em lactil-CoA com gene de fosfotransbutilase, gene de butirato quinase e gene de PHA sintase, (iv) transformando a célula ou planta tendo gene de fosfotransbutilase com gene de enzima convertendo lactato e 3-hidroxiacanoato em lactil-CoA e 3-hidroxiacetoil-CoA, respectivamente, gene de butirato quinase e gene de PHA sintase, (v) transformando a célula ou planta tendo gene de butirato quinase com gene de enzima convertendo lactato e 3-hidroxiacanoato em lactil-CoA e 3-hidroxiacetoil-CoA, respectivamente, gene de fosfotransbutilase e gene de PHA sintase, (vi) transformando a célula ou planta tendo gene de PHA sintase usando lactil-CoA como um substrato e gene de enzima convertendo lactato e 3-hidroxiacanoato em lactil-CoA e 3-hidroxiacetoil-CoA, respectivamente, com gene de fosfotransbutilase e gene de butirato quinase, (vii) transformando a célula ou planta tendo gene de enzima convertendo lactato e 3-hidroxiacanoato em lactil-CoA e 3-hidroxiacetoil-CoA, respectivamente, e gene de fosfotransbutilase com gene de PHA sintase usando lactil-CoA como um substrato e gene de butirato quinase, (viii) transformando a célula ou planta tendo gene de enzima convertendo 3-hidroxiacanoato em 3-hidroxiacetoil-CoA e gene de butirato quinase com gene de PHA sintase e gene de fosfotransbutilase, (ix) transformando a célula ou planta tendo gene de PHA sintase usando lactil-CoA como um substrato e gene de butirato

quinase com gene de enzima convertendo lactato e 3-hidroxiacanoato em lactil-CoA e 3-hidroxiacetoil-CoA, respectivamente, e gene de fosfotransbutilase, (x) transformando a célula ou planta tendo gene de PHA sintase e gene de fosfotransbutilase com gene de enzima convertendo lactato e 3-hidroxiacanoato em lactil-CoA e 3-hidroxiacetoil-CoA, respectivamente, e gene de butirato quinase, (xi) transformando a célula ou planta tendo gene de fosfotransbutilase e gene de butirato quinase com gene de enzima convertendo lactato e 3-hidroxiacanoato em lactil-CoA e 3-hidroxiacetoil-CoA, respectivamente, e gene de PHA sintase usando lactil-CoA como um substrato, (xii) transformando a célula ou planta tendo gene de enzima convertendo lactato e 3-hidroxiacanoato em lactil-CoA e 3-hidroxiacetoil-CoA, respectivamente, gene de fosfotransbutilase e gene de butirato quinase com gene de PHA sintase usando lactil-CoA como um substrato, (xiii) transformando a célula ou planta tendo gene de fosfotransbutilase, gene de butirato quinase e gene de PHA sintase com gene de enzima convertendo lactato em lactil-CoA, (xiv) transformando a célula ou planta tendo gene de enzima convertendo lactato e 3-hidroxiacanoato em lactil-CoA e 3-hidroxiacetoil-CoA, respectivamente, gene de butirato quinase e gene de PHA sintase com gene de fosfotransbutilase, ou (xv) transformando a célula ou planta tendo gene de enzima convertendo lactato e 3-hidroxiacanoato em lactil-CoA e 3-hidroxiacetoil-CoA, respectivamente, fosfotransbutilase e gene de PHA sintase com gene de butirato quinase. No entanto, o escopo da presente invenção não é limitado aos exemplos concretos descritos acima.

[00016] Preferivelmente, na presente invenção, o gene de enzima convertendo lactato e 3-hidroxiacanoato em lactil-CoA e 3-hidroxiacetoil-CoA, respectivamente, é gene de propionil-CoA transferase (pct).

[00017] Preferivelmente, na presente invenção, o gene de fosfotransbutilase (Ptb) é derivado de *Clostridium acetobutyricum*.

[00018] Preferivelmente, na presente invenção, o gene de butirato

quinase (Buk) é derivado de *Clostridium acetobutyricum*.

[00019] Na presente invenção, gene de Cat2 derivado de *Clostridium kluyveri* pode ser usado em vez do gene Ptb e gene buk. O gene de Cat2 é uma enzima convertendo 4-hidroxibutirato em 4-hidroxibutirill-CoA como o gene Ptb e gene buk. Preferivelmente, a sequência nucleotídica de gene de Cat2 é SEQ ID No: 30.

[00020] Ademais, no caso em que um gene codificando PHA sintase para o qual lactil-CoA é um substrato é phaC, as células ou plantas são transformadas com um vetor recombinante compreendendo gene de pct, ptb e buk. Ao mesmo tempo, as células ou plantas são transformadas com um vetor compreendendo phaC, ou phaC é inserido em um cromossomo. Em adição, no caso em que um gene codificando PHA sintase para o qual lactil-CoA é um substrato é phaC, as células ou plantas são transformadas com um vetor recombinante compreendendo gene de pct. Ao mesmo tempo, as células ou plantas são transformadas com um vetor compreendendo phaC, ou phaC é inserido em um cromossomo.

[00021] Como é conhecido na técnica, vários microorganismos têm um gene codificando PHA sintase (Patente coreana expedida No. 10-250830). Os seguintes são exemplos de tais microorganismos: microorganismos do gênero *Achromobacter* que incluem *Achromobacter* sp., *Achromobacter xylosoxidans*, etc., microorganismos do gênero *Acinetobacter* que incluem *Acidovorax delafieldii*, *Acidovax facilis*, *Acinetobacter* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter lwoffii*, etc., microorganismos do gênero *Aeromonas* que incluem *Actinomyces* sp., *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, etc., microorganismos do gênero *Alcaligenes* que incluem *Alcaligenes aestus*, *Alcaligenes denitrificans*, *Alcaligenes eutrophus* (depois renomeado como *Ralstonia eutropha*, é renomeado como *Wautersia eutropha*), *Alcaligenes faecalis*, *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes pacificus*, *Alcaligenes paradoxus*, *Alcaligenes venustus*,

etc., microorganismos do gênero *Amoebobacter* que incluem *Alteromonas macleodii*, *Amoebobacter roseu*, *Amoebobacter pendens*, etc., microorganismos do gênero *Azospirillum* que incluem *Aphanocapa* sp., *Aphanothece* sp., *Aquaspirillum autotrophicum*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azospirillum* sp., *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, etc., microorganismos do gênero *Azotobacter* que incluem *Azotobacter* sp., *Azotobacter agilis*, *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter macrocytogenes*, *Azotobacter vinelandii*, etc., microorganismos do gênero *Bacillus* que incluem *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, etc., microorganismos do gênero *Beggiatoa* que incluem *Beggiatoa* sp., *Beggiatoa alba*, etc., microorganismos do gênero *Beijerinckia* que incluem *Beijerinckia indicus*, *Beijerinckia mobilis*, etc., microorganismos do gênero *Beneckea* que incluem *Beneckea natrigens*, *Beneckea pelagia*, etc., microorganismos do gênero *Caulobacter* que incluem *Bordetella pertussis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Caryophamon latum*, *Caulobacter bacteroides*, *Caulobacter crescentus*, etc., microorganismos do gênero *Chlorogloea* que incluem *Chloroflexus aurantiacus*, *Chlorogloea fritschii*, etc., microorganismos do gênero *Chromatium* que incluem *Chromatium minutissimum*, *Chromatium okenii*, *Chromatium tepidum*, etc., microorganismos do gênero *Chromobacterium* que incluem *Chromobacterium violaceum*, etc., microorganismos do gênero *Clostridium* que incluem *Clostridium botulinum*, *Clostridium sphenoides*, etc., microorganismos do gênero *Comamonas* que incluem *Comamonas acidovorans*, *Comamonas testosteroni*, etc., microorganismos do gênero *Corynebacterium* que incluem *Corynebacterium autotrophicum*, *Corynebacterium hydrocarboxydans*, etc., microorganismos do gênero *Derxia* que incluem *Cyanobacteria*, *Derxia gummosa*, etc., microorganismos do gênero *Desulfonema* que incluem *Desulfococcus multivorans*, *Desulfonema limicola*, *Desulfonema magnum*, etc., microorganismos do gênero

Ectothiorhodospira que incluem *Desulfosacina variabilis*, *Desulfovibrio sapovorans*, *Ectothiorhodospira halochloris*, *Ectothiorhodospira mobilis*, *Ectothiorhodospira vacuolata*, etc., microorganismos do gênero *Halobacterium* que incluem *FerroBacillus ferroxidans*, *Flavobacterium* sp., *Haemophilus influenzae*, *Halobacterium gibbonsii*, *Halobacterium volcanii*, etc., microorganismos do gênero *Hydrogenophaga* que incluem *Haloferax mediterranei*, *Hydroclathratus clathratus*, *Hydrogenomonas facilis*, *Hydrogenophaga flava*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Hydrogenophaga taeniospiralis*, etc., microorganismos do gênero *Hyphomicrobium* que incluem *Hyphomicrobium vulgare*, etc., microorganismos do gênero *Methylbacterium* que incluem *Ilyobacter delafieldii*, *Labrys monachus*, *Lamprocystis reseopersicina*, *Lampropedia hyaline*, *Legionella* sp., *Leptothrix discophorus*, *Methylbacterium AM1*, *Methylbacterium extorquens*, etc., microorganismos do gênero *Methylosinus* que incluem *Methylococcus thermophilus*, *Methlocystis parvus*, *Methylomonas methanica*, *Methylosinus sporium*, *Methylosinus trichosporium*, etc., microorganismos do gênero *Micrococcus* que incluem *Methylovibrio soehngeni*, *Micrococcus denitrificans*, *Micrococcus halodenitrificans*, etc., microorganismos do gênero *Mycobacterium* que incluem *Mycobacterium album*, *Mycobacterium vaccae*, etc., microorganismos do gênero *Nitrobacter* que incluem *Nitrobacter agilis*, *Nitrobacter winogradskyi*, etc., microorganismos do gênero *Nocardia* que incluem *Nocardia alba*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia lucida*, *Nocardia rubra*, etc., microorganismos do gênero *Photobacterium* que incluem *Paracoccus dentrificans*, *Oscillatoria limosa*, *Penicillium ciclopium*, *Photobacterium mandapamensis*, *Photobacterium phosphoreum*, etc., microorganismos do gênero *Pseudomonas* que incluem *Physarum ploycephalum* e *Pseudomonas glathei*, *Pseudomonas indigofera*, *Pseudomonas lemonieri*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas marina*, *Pseudomonas mixta*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas oxalaticus*,

Pseudomonas pseudoAlcaligenes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas Alcaligenes*, *Pseudomonas asplenii*, *Pseudomonas butanovora*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas coronafaciens*, *Pseudomonas dacunhae*, *Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomonas echinoides*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas rubrilineas*, *Pseudomonas saccharophila*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas thermophilus*, *Pseudomonas viridiflava*, etc., microorganismos do gênero *Ralstonia*, microorganismos do gênero *Rhizobium* que incluem *Rhizobium hedysarum*, *Rhizobium lupini*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium trifoli*, etc., microorganismos do gênero *RhodoBacillus*, microorganismos do gênero *Rhodobacter* que incluem *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, etc., microorganismos do gênero *Rhodococcus* que incluem *Rhodococcus rhodochrous*, etc., microorganismos do gênero *Rhodocyclus* que incluem *Rhodocyclus gelatinosus*, *Rhodocyclus tenuis*, etc., microorganismos do gênero *RhodoPseudomonas* que incluem *Rhodomicrobium vannielii* e *RhodoPseudomonas acidophila*, *RhodoPseudomonas capsulata*, etc., microorganismos do gênero *Rhodospirillum* que incluem *Rhodospirillum molischianum*, *Rhodospirillum rubrum*, etc., microorganismos do gênero *Spirillum* que incluem *Sphingomonas paucimobilis*, *Spirillum itersomii*, *Spirillum serpens*, etc., microorganismos do gênero *Spirulina* que incluem *Spirulina jenneri*, *Spirulina maxima*, *Spirulina subsaksa*, etc., microorganismos do gênero *Staphylococcus* que incluem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus*, etc., microorganismos do gênero *Stella* que incluem *Stella humosa*, *Stella vacuolata*, etc., microorganismos do gênero *Streptomyces* que incluem *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces coelicolor*, etc., microorganismos do gênero *ThioBacillus* que incluem *Syntrophomonas wolfei*, *Thermophilic Cyanobacteria*, *Thermus thermophilus*, *ThioBacillus A2*, *ThioBacillus acidophilus*, *ThioBacillus versutus*, etc.,

microorganismos do gênero *Thiocapsa* que incluem *Thiocapsa pfennigii*, etc., microorganismos do gênero *Zoogloea* que incluem *Thiocystis violacea*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Xanthobacter autotrophicus*, *Xanthomonas maltophilia*, *Zoogloea ramigera*, etc.

[00022] Preferivelmente, o gene de poli-hidroxialcanoato sintase (PHA) da presente invenção é phaC1_{ps6-19} originado de *Pseudomonas* sp. 6-19. Mais preferivelmente, o gene de PHA sintase codifica a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 8 tendo variações de: a) S325T e Q481M; b) E130D e Q481K; c) S325T e Q481K; d) E130D e Q481M; e) E130D e Q481R; f) E130D, S325T e Q481M; g) E130D, S325T e Q481K; h) E130D, S477R e Q481K; i) E130D, S477R e Q481M; j) E130D, S477R e Q481R; k) E130D, S477H e Q481K; l) E130D, S477H e Q481M; m) E130D, S477H e Q481R; n) E130D, S477F e Q481K; o) E130D, S477F e Q481M; p) E130D, S477F e Q481R; q) E130D, S477Y e Q481K; r) E130D, S477Y e Q481M; s) E130D, S477Y e Q481R; t) E130D, S325T, S477R e Q481M; u) E130D, S325T, S477R e Q481K; v) E130D, S325T, S477F e Q481M; w) E130D, S325T, S477G e Q481M; ou x) E130D, S325T, S477F e Q481K. Estas variações de PHA sintase são mais preferíveis no aspecto de usar lactil-CoA como um substrato.

[00023] Na presente invenção, a célula é preferivelmente um microorganismo. Mais preferivelmente, o microorganismo é *E. Coli*.

[00024] Na presente invenção, a célula ou planta tendo o gene de enzima convertendo lactato e 3-hidroxialcanoato em lactil-CoA e 3-hidroxialconoil-CoA, respectivamente, gene de fosfotransbutilase, gene de butirato quinase e gene de poli-hidroxialcanoato sintase (PHA) juntos podem ser cultivados em um meio de cultura compreendendo pelo menos um selecionado dentre o grupo consistindo de 4-hidroxibutirato, 3-hidroxipropionato e 3-hidroxibutirato para produzir um copolímero compreendendo unidade de monômero de 4-hidroxibutirato, unidade de

monômero de lactato e opcionalmente 3-hidroxiálcanoato. Se uma célula ou planta conseguir biossintetizar lactato, 4-hidroxibutirato e 3-hidroxiálcanoato a partir de outras fontes de carbono tal como glicose, ácido cítrico, etc., pode não haver necessidade de ainda adicionar 4-hidroxibutirato, lactato e assim por diante para o meio de cultura.

[00025] Por exemplo, poli(4-hidroxibutirato-co-3-hidroxipropionato-co-lactato) pode ser preparado cultivando a célula ou planta em um outro meio de cultura compreendendo 4-hidroxibutirato (4-HB) e 3-hidroxipropionato (3-HP).

[00026] Por exemplo, tetrapolímero de 3-hidroxibutirato-3-hidroxipropionato-4-hidroxibutirato-lactato pode ser preparado cultivando a célula ou planta em um outro meio de cultura compreendendo 4-hidroxibutirato (3-HP), 3-hidroxipropionato (3-HP) e 3-hidroxibutirato (3-HB).

[00027] Transformação de plantas para preparar planta compreendendo genes de transferase e sintase pode ser realizada por métodos convencionais usando Agrobactérias ou vetores de vírus. Por exemplo, plantas transformadas são obtidas transformando uma Agrobactéria com um vetor recombinante contendo o gene inventivo e infectando um tecido, etc. da planta alvo com uma Agrobactéria transformada. Mais especificamente, a planta transformada pode ser preparada pré-cultivando um explante de planta de interesse, e então transformando o explante co-cultivando o explante e uma Agrobactéria transformada; cultivando referidos explantes infectados para induzir calos; e excisando o calo obtido, e cultivando o mesmo em meio indutor de brotos.

[00028] O termo “explante,” como usado aqui, significa um fragmento de tecido cortado de uma planta, e inclui cotilédone ou hipocótilo. Cotilédone ou hipocótilos podem ser usados como o explante da presente invenção. É mais preferível usar cotilédone obtido desinfetando e lavando as sementes da planta, e germinado o mesmo em meio de cultura MS.

[00029] Plantas transformadas úteis para a presente invenção incluem, mas não estão limitadas a, tabaco, tomate, pimentas vermelhas, feijões, arroz, e milho. Também, mesmo que uma planta transformada seja uma que propaga sexualmente, será óbvio para o versado na técnica que tal planta pode ser reproduzida assexuadamente usando cultura de tecido de planta, etc.

[BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS]

[00030] Figura 1 é um diagrama simples de expressão constitutiva de vetor expressando PHA sintase e CP-PCT juntos.

[00031] Figura 2 é um mapa de genes de plasmídeo recombinante pPs619C1300-CPPCT compreendendo gene de PHA sintase e gene CP-PCT de acordo com a presente invenção.

[00032] Figura 3 é um mapa de genes de plasmídeo recombinante pTacCpPctNCvEC compreendendo gene de PHA sintase e gene CP-PCT de acordo com a presente invenção.

[00033] Figura 4 é um mapa de genes de plasmídeo recombinante pMCSPtbBuk compreendendo genes Ptb e Buk de acordo com a presente invenção.

[00034] Figura 5 é um resultado de RMN de copolímero de 4-hidroxibutirato-lactato preparado por E. Coli recombinante transformado com plasmídeo pPs619C1300-CPPCT/pMCSPtbBuk.

[00035] Figura 6 são resultados de RMN de terpolímero de 3-hidroxipropionato-4-hidroxibutirato-lactato e tetrapolímero de 3-hidroxibutirato-3-hidroxipropionato-4-hidroxibutirato-lactato preparado pelo E. Coli recombinante transformado com plasmídeo pPs619C1300-CPPCT/pMCSPtbBuk.

[00036] Figura 7 são resultados GC-MSD de terpolímero 3-hidroxipropionato-4-hidroxibutirato-lactato e tetrapolímero 3-hidroxibutirato-3-hidroxipropionato-4-hidroxibutirato-lactato preparado pelo E. Coli recombinante transformado com plasmídeo pPs619C1300-

CPPCT/pMCSPtbBuk.

[MODOS PARA REALIZAR A INVENÇÃO]

[00037] Em seguida, a presente invenção é descrita em considerável detalhe. Os exemplos a seguir são oferecidos como forma de ilustração para ajudar os versados na arte a compreender o presente invenção, e não são destinados a limitar o escopo da invenção.

Exemplo 1: Construção de um plasmídeo recombinante compreendendo gene de pct e gene de PHA sintase

[00038] Plasmídeos recombinantes, pPs619C1300-CPPCT e pTacCpPctNCvEC, compreendendo gene de pct e gene de PHA sintase são construídos para preparar um copolímero compreendendo unidade de 4-hidroxibutirato e unidade de lactato.

(1) Construção de plasmídeo pPs619C1300-CPPCT

[00039] Gene de propionil-CoA transferase (CP-PCT) derivado de *Clostridium propionicum* foi usado como um gene de pct, e gene de PHA sintase derivado de *Pseudomonas* sp. 6-19 foi usado como o gene de PHA sintase.

[00040] O operon de sistema de expressão constitutivo expressando PHA sintase e CP-PCT foi construído como na figura 1. CP-PCT é bem conhecido por ter toxicidade para o microorganismo hospedeiro. Isto é, em sistema de expressão de promotor de tac ou promotor de T7 induzido por IPTG (Este sistema é amplamente usado na expressão de uma proteína recombinante), todos os microorganismos morrem logo após a adição de indutor. Por causa disso, pensa-se como sendo adequado usar sistema de expressão, que é fracamente expressado, mas continuamente expressado, de acordo com o crescimento do microorganismo. Gene CP-PCT foi obtido por PCR usando o DNA cromossômico de *Chostridium propionicum* (DSM1682) como gabarito e os iniciadores de SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 feitos baseados na sequência de gene de pct (Selmer et al., Eur J Biochem., 269:372,

2002). A sequência de nucleotídeos é mostrada na SEQ ID NO: 29.

SEQID NO:1:5-ggaattcATGAGAAAGGTTCCCATATTACCGCAGATGA

SEQ ID NO:2:5-gctctagattaggacttcatttccttcagaccattaagccttctg

[00041] O sítio de enzima de restrição NdeI de CP-PCT selvagem foi removido por método SDM para a facilidade de clonagem. Além disso, PCR de sobreposição foi realizado com os iniciadores de SEQ ID NO: 3 e 4 para adicionar sítio de reconhecimento SbfI/NdeI.

SEQ ID NO: 3: 5-agg cct gca ggc gga taa caa ttt cac aca gg- 3

SEQ ID NO: 4: 5-gcc cat atg tct aga tta gga ctt cat ttc c- 3

[00042] Para separar o gene de PHA sintase (*phaC1_{Ps6-19}*) originado de *Pseudomonas* sp. 6-19 (KCTC 11027BP), DNA total de *Pseudomonas* sp. 6-19 foi extraído, e os iniciadores de SEQ ID NO: 5 e 6 foram preparados baseados na sequência de gene *phaC1_{Ps6-19}* (Ae-jin Song, Master's Thesis, Department of Chemical and Biomolecular Engineering, KAIST, 2004) e PCR foi realizado para obter o gene de *phaC1_{Ps6-19}*. A sequência nucleotídica de gene de *phaC1_{Ps6-19}* é mostrada na SEQ ID NO: 7, da qual a sequência de aminoácido avaliada é mostrada em SEQ ID NO: 8.

SEQ ID NO:5:5- GAG AGA CAA TCA AAT CAT GAG TAA CAA GAG TAA CG -3

SEQ ID NO:6:5- CAC TCA TGC AAG CGT CAC CGT TCG TGC ACG TAC -3

[00043] O gene *phaC1_{Ps6-19}* obtido acima foi inserido no sítio BstBI/SbfI de pBluescript II (Stratagene Co., USA) para fazer vetor recombinante pPs619C1. Sítios BstBI contidos no interior foram removidos por método SDM (mutagênese sítio-dirigida) sem mutação de aminoácido para fazer fragmento de gene de sintase *phaC1_{Ps6-19}* tendo dois sítios BstBI/SbfI apenas em ambas as extremidades, e PCR de sobreposição foi realizado com os iniciadores de SEQ ID NO: 9 e 10, SEQ ID NO: 11 e 12, e SEQ ID NO: 13 e 14 para adicionar sítio de reconhecimento BstBI/SbfI.

SEQ ID NO: 9: 5- atg ccc gga gcc ggt tcg aa - 3

SEQ ID NO: 10: 5- CGT TAC TCT TGT TAC TCA TGA TTT GAT TGT CTC TC - 3

SEQ ID NO: 11: 5- GAG AGA CAA TCA AAT CAT GAG TAA CAA GAG TAA CG - 3

SEQ ID NO: 12: 5- CAC TCA TGC AAG CGT CAC CGT TCG TGC ACG TAC - 3

SEQ ID NO: 13: 5- GTA CGT GCA CGA ACG GTG ACG CTT GCA TGA GTG - 3

SEQ ID NO: 14: 5- aac ggg agg gaa cct gca gg - 3

[00044] Três posições (130, 325, e 481) de aminoácido que afetam a atividade de síntese de SCL (PHA comprimento de cadeia curto) de phaC1_{Ps6-19} sintase foram encontradas por meio de análise de alinhamento de sequência de aminoácido, e pPs619C1300 compreendendo o gene codificando o mutante tendo mutações de E130D, S325T e Q481M na sequência de aminoácido phaC1_{Ps6-19} sintase foi construído por método SDM. O mutante de phaC1_{Ps6-19} sintase foi mostrado na tabela 1 abaixo.

Tabela 1

Vetor recombinante	Substituição de ácido nucleico	Substituição de aminoácido	Iniciador
pPs619C1300	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15/16
	AGC → ACC	S325T	SEQ ID NO: 17/18
	CAG → ATG	Q481M	SEQ ID NO: 19/20

SEQ ID NO: 15: 5- atc aac ctc atg acc gat gcg atg gcg ccg acc- 3

SEQ ID NO: 16: 5- ggt cgg cgc cat cgc atc ggt cat gag gtt gat- 3

SEQ ID NO: 17: 5- CTG ACC TTG CTG GTG ACC GTG CTT GAT ACC ACC- 3

SEQ ID NO: 18: 5- GGT GGT ATC AAG CAC GGT CAC CAG CAA GGT CAG- 3

SEQ ID NO: 19: 5- CGA GCA GCG GGC ATA TC A TGA GCA TCC TGA

ACC CGC- 3

SEQ ID NO: 20: 5- GCG GGT TCA GGA TGC TCA TGA TAT GCC CGC
TGC TCG- 3

[00045] O vetor pPs619C1300 obtido foi excisado com SbfI/NdeI, e o gene CP-PCT clonado foi inserido no sítio de reconhecimento de SbfI/NdeI para construir o vetor recombinante pPs619C1300-CPPCT (figura 2).

(2) Construção de plasmídeo pTacCpPctNCvEC

[00046] Vetor pTac99A (Park e Lee, J. Bacteriol. 185, 5391-5397, 2003) foi cortado com SspI para obter um fragmento de gene compreendendo promotor Tac e terminador de transcrição, e o fragmento foi inserido em pTrc99A (Pharmacia Biotech, Suécia) excisado com enzima de restrição SspI para fazer vetor pTaclac. Gene phaEC foi amplificado com o DNA cromossômico de *Chromatium vinosum* (DSMZ180) como gabarito e os iniciadores de SEQ ID NO: 21 e 22.

SEQ ID NO: 21: ggaaatc cat ATGACGATGTTCTCGCTCATGGCG

SEQ ID NO: 22: ggaaatc catatg atc cag ggc cac tat ctc caa ctg

[00047] O gene phaEC amplificado foi inserido no sítio NdeI excisado do vetor pTaclac para fazer vetor pTaclacNCvEC. Além disso, gene de pct foi obtido cortando pPs619C1300-CPPCT com EcoRI/XbaI, e o gene de pct foi inserido no sítio cortado com EcoRI/XbaI de pTaclacNCvEC para fazer pTacCpPctNCvEC (figura 3).

(3) Construção de plasmídeo pMCSPtbBuk

[00048] Genes ptb e buk foram construídos como um operon em cepa de *Clostridium acetobutyricum*, e essa sequência de nucleotídeos foi mostrada em SEQ ID NO: 27 e 28, respectivamente. Gene ptb/buk foi amplificado com os iniciadores de SEQ ID NO: 23 e 24 a partir do DNA cromossômico de *Clostridium acetobutyricum* (ATCC824).

SEQ ID NO: 23: GGCAGAGAG ACAATCAAAT C
ATGATTAAGAGTTTAAATG

SEQ ID NO: 24: ggaattc catatg tta ttt gta ttc ctt agc ttt ttc ttc tcc

[00049] Ademais, PCR usando pC1300-CPPCT como gabarito foi realizado com os iniciadores de SEQ ID NO: 25 e 26 para amplificar o gene de sítio de reconhecimento de SbfI em pC1300-CPPCT.

SEQ ID NO: 25: GGGCAGATGT GCCGGCAGAC

SEQ ID NO: 26: gat ttg att gtc tct ctg ccg

[00050] PCR de sobreposição usando o fragmento de gene obtido com os iniciadores de SEQ ID NO: 23 e 24 e o fragmento de gene obtido com os iniciadores de SEQ ID NO: 25 e 25 como gabarito foi realizado com os iniciadores de SEQ ID NO: 24 e 25 para finalmente obter fragmento de gene ptb/buk compreendendo o sítio de reconhecimento de SbfI/NdeI. O fragmento de gene ptb/buk obtido foi cortado com SbfI/NdeI, e então foi inserido em pC1300-CPPCT excisado com a mesma enzima para obter plasmídeo pPtbBuk. Plasmídeo pPtbBuk foi cortado com XmaI/XhoI para obter o fragmento de gene compreendendo o promotor de gene de biossíntese de *R. eutropha* PHA e gene ptb/buk, e o gene obtido foi inserido em pBBR1MCS (NCCB 3433) cortado com XmaI/XhoI para obter plasmídeo pMCSPtbBuk (figura 4).

Exemplo 2: Preparação de copolímero de 4-hidroxibutirato-lactato

[00051] *E.coli* Top 10 (Invitrogen) foi transformado com o pPs619C1300-CPPCT obtido no exemplo 1 e pMCSPtbBuk juntos para obter Top10/pPs619C1300-CPPCT/pMCSPtbBuk de *E.coli*.

[00052] O transformante foi cultivado em duas etapas para obter copolímero de 4-hidroxibutirato-lactato como a seguir: Primeiro, Top10/pPs619C1300-CPPCT/pMCSPtbBuk de *E.coli* recombinante transformado foi cultivado durante 24 horas em 100 mL de meio de cultura LB (Bacto™ Triptona(BD) 10 g/L, extrato de levedura Bacto™ (BD) 5 g/L; NaCl (amresco) 10 g/L) contendo 100 mg/L de ampicilina e 30 mg/L de cloranfenicol, e então o meio de cultura foi centrifugado por 15 minutos a 4°C, 1000 g para coletar células.

[00053] As células coletadas foram anaerobicamente produzidas

durante 3 dias em meio de cultura MR (Glucose 10 g, KH_2PO_4 6,67 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8 g, ácido cítrico 0.8 g e solução de traço de metal 5 mL por 1L; composição da solução de metal de traço: 5M HCl 5 mL, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g, CaCl_2 2 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,2 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{21} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, e $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g por 1L) ainda compreendendo 2 g/L de 4-hidroxibutirato (4-HB) e 100 mg/L de ampicilina e 30 mg/L de cloranfenicol.

[00054] O meio de cultura foi centrifugado por 15 minutos a 4°C, 1000 para coletar células, e as células foram lavadas 4 vezes com água destilada em abundância e secadas por 12 horas a 80°C. As células completamente secas foram quantificadas, e reagiram com metanol a 100°C em solvente clorofórmio sob o catalisador de ácido sulfúrico. Metade do volume de água destilada foi adicionada em temperatura ambiente ao clorofórmio, e misturada. Em seguida, a mistura foi assentada até ser separada em duas camadas. Nas duas camadas, a camada clorofórmio dissolvendo monômero metilado foi coletada, e os ingredientes do polímero foram analisados com gás cromatografia. Benzoato foi usado como padrão interno.

[00055] Como um resultado da análise, 4-hidroxibutirato de metila e lactato de metila foram detectados em transformante Top10/pPs619C1300-CPPCT/pMCSPtbBuk de E.coli, o que significa que o novo copolímero 4-hidroxibutirato-lactato copolímero [(poli(4-hidroxibutirato-co-lactato))] foi preparado por E. Coli recombinante. Os resultados de RMN do copolímero poli(4-hidroxibutirato-co-lactato) obtido foram mostrados na figura 5.

Exemplo 3: Preparação de terpolímero de 4-hidroxibutirato-3-hidroxipropionato-lactato

[00056] Terpolímero de 4-hidroxibutirato-3-hidroxipropionato-lactato foi preparado de acordo com o método do exemplo 2 exceto que as células coletadas foram anaerobicamente cultivadas durante 3 dias em meio de cultura MR ainda contendo 2 g/L de 4-hidroxibutirato (4-HB), 2 g/L de 3-

hidroxipropionato (3-HP), 100 mg/L de ampicilina e 30 mg/L de cloranfenicol em vez de meio de cultura MR ainda contendo 2 g/L de 4-HB, 100 mg/L de ampicilina e 30 mg/L de cloranfenicol.

[00057] Como resultado da análise, 4-hidroxibutirato de metila, 3-hidroxipropionato de metila e lactato de metila foram detectados em transformante Top10/pPs619C1300-CPPCT/pMCSPTbBuk de E.coli, o que significa que o novo terpolímero de 4-hidroxibutirato-3-hidroxipropionato-lactato [poli(4-hidroxibutirato-co-3-hidroxipropionato-co-lactato)] foi preparado por E. Coli recombinante. Os resultados de ¹H-RMN e GC-MSD do terpolímero de 4-hidroxibutirato-3-hidroxipropionato-lactato obtido foram mostrados nas figuras 6 e 7, respectivamente.

Exemplo 4: Preparação de copolímero de 3-hidroxibutirato-4-hidroxibutirato-lactato

[00058] Terpolímero de 3-Hidroxibutirato-4-hidroxibutirato-lactato foi preparado de acordo com o método do exemplo 2 exceto que as células coletadas foram cultivadas anaerobicamente durante 3 dias no meio de cultura MR ainda contendo 2 g/L de 4-hidroxibutirato (4-HB), 1 g/L de 3-hidroxibutirato (3-HB), 100 mg/L de ampicilina e 30 mg/L de cloranfenicol em vez de meio de cultura MR ainda contendo 2 g/L de 4-HB, 100 mg/L de ampicilina e 30 mg/L de cloranfenicol.

[00059] Como resultado da análise, 4-hidroxibutirato de metila, 3-hidroxibutirato de metila e lactato de metila foram detectados em transformante Top10/pPs619C1300-CPPCT/pMCSPTbBuk de E.coli, o que significa que o terpolímero de 3-hidroxibutirato-4-hidroxibutirato-lactato [poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato-co-lactato)] foi preparado por E. Coli recombinante.

Exemplo 5: Preparação de tetrapolímero de 3-hidroxibutirato-3-hidroxipropionato-4-hidroxibutirato-lactato

Tetrapolímero de 3-hidroxibutirato-3-hidroxipropionato-4-

hidroxibutirato-lactato foi preparado de acordo com o método do exemplo 2 exceto que as células coletadas foram cultivadas anaerobicamente durante 3 dias no meio de cultura MR ainda contendo 2 g/L de 3-hidroxibutirato (3-HB), 2 g/L de 3-hidroxipropionato (3-HP), 1 g/L de 4-hidroxibutirato (4-HB) e 100 mg/L de ampicilina em vez de meio de cultura MR ainda contendo 2 g/L de 4-HB, 100 mg/L de ampicilina e 30 mg/L de cloranfenicol.

[00060] Como resultado da análise, 4-hidroxibutirato de metila, 3-hidroxibutirato de metila, 3-hidroxipropionato de metila e lactato de metila foram detectados em transformante Top10/pPs619C1300-CPPCT/pMCSPtbBuk de E.coli, o que significa que tetrapolímero de 3-hidroxibutirato-3-hidroxipropionato-4-hidroxibutirato-lactato foi preparado por E. Coli recombinante. Os resultados de ¹H-RMN e GC-MSD do tetrapolímero de 3-hidroxibutirato-3-hidroxipropionato-4-hidroxibutirato-lactato obtido foram mostrados na figura 6 e 7, respectivamente.

Exemplo 6: Preparação de diversos mutantes

[00061] Diversos mutantes de PHA sintase foram preparadas como a construção do pPs619C1300 com os iniciadores abaixo. Os mutantes obtidos foram mostrados nas tabelas 2, 3, 4 e 5.

E130D

SEQ ID NO: 15: 5'-atc aac ctc atg acc gat gcg atg gcg ccg acc- 3'

SEQ ID NO: 16: 5' -ggg cgg cgc cat cgc atc ggt cat gag gtt gat- 3'

S325T

SEQ ID NO: 17: 5'-CTG ACC TTG CTG GTG ACC GTG CTT GAT ACC ACC- 3'

SEQ ID NO: 18: 5'- GGT GGT ATC AAG CAC GGT CAC CAG CAA GGT CAG- 3'

S477R

SEQ ID NO: 31: 5'-gaa ttc gtg ctg tcg agc cgc ggg cat atc- 3'

SEQ ID NO: 32: 5'-gat atg ccc gcg gct cga cag cac gaa ttc- 3'

S477H

SEQ ID NO: 33: 5'-gaa ttc gtg ctg tcg agc cat ggg cat atc- 3'

SEQ ID NO: 34: 5'-gat atg ccc atg gct cga cag cac gaa ttc- 3'

S477F

SEQ ID NO: 35: 5'- gaa ttc gtg ctg tcg agc ttt ggg cat atc- 3'

SEQ ID NO: 36: 5'- gat atg ccc aaa gct cga cag cac gaa ttc- 3'

S477Y

SEQ ID NO: 37: 5'-gaa ttc gtg ctg tcg agc tat ggg cat atc- 3'

SEQ ID NO: 38: 5'-gat atg ccc ata gct cga cag cac gaa ttc- 3'

S477G

SEQ ID NO: 39: 5'-gaa ttc gtg ctg tcg agc ggc ggg cat atc- 3'

SEQ ID NO: 40: 5'-gat atg ccc gcc gct cga cag cac gaa ttc- 3'

Q481K

SEQ ID NO: 41: 5'-ggg cat atc aaa agc atc ctg aac ccg c- 3'

SEQ ID NO: 42: 5'-gcg ggt tca gga tgc ttt tga tat gcc c- 3'

Q481M

SEQ ID NO: 43: 5'-ggg cat atc atg agc atc ctg aac ccg c- 3'

SEQ ID NO: 44: 5'-gcg ggt tca gga tgc tca tga tat gcc c- 3'

Q481R

SEQ ID NO: 45: 5'-ggg cat atc cgc agc atc ctg aac ccg c- 3'

SEQ ID NO: 46: 5'-gcg ggt tca gga tgc tgc gga tat gcc c- 3'

Tabela 2

Sintase Recombinante	Substituição de ácido nucléico	Substituição de Aminoácido	Iniciadores
pPs619C1200	AGC → ACC	S325T	SEQ ID NO: 17, 18
	CAG → ATG	Q481M	SEQ ID NO: 43, 44
pPs619C1202	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	CAG → AAA	Q481K	SEQ ID NO: 41, 42
pPs619C1203	AGC → ACC	S325T	SEQ ID NO: 17, 18
	CAG → AAA	Q481K	SEQ ID NO: 41, 42
pPs619C1204	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	CAG → ATG	Q481M	SEQ ID NO: 43, 44
pPs619C1205	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	CAG → CGC	Q481R	SEQ ID NO: 45, 46

Tabela 3

Sintase Recombinante	Substituição de ácido nucléico	Substituição de Aminoácido	Iniciadores
pPs619C1300	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → ACC	S325T	SEQ ID NO: 17, 18
	CAG → ATG	Q481M	SEQ ID NO: 43, 44
pPs619C1301	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → ACC	S325T	SEQ ID NO: 17, 18
	CAG → AAA	Q481K	SEQ ID NO: 41, 42
pPs619C1304	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → CGC	S477R	SEQ ID NO: 31, 32
	CAG → AAA	Q481K	SEQ ID NO: 41, 42
pPs619C1305	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → CGC	S477R	SEQ ID NO: 31, 32
	CAG → ATG	Q481M	SEQ ID NO: 43, 44
pPs619C1306	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → CGC	S477R	SEQ ID NO: 31, 32
	CAG → CGC	Q481R	SEQ ID NO: 45, 46
pPs619C1307	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → CAT	S477H	SEQ ID NO: 33, 34
	CAG → AAA	Q481K	SEQ ID NO: 41, 42
pPs619C1308	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → CAT	S477H	SEQ ID NO: 33, 34
	CAG → ATG	Q481M	SEQ ID NO: 43, 44
pPs619C1309	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → CAT	S477H	SEQ ID NO: 33, 34
	CAG → CGC	Q481R	SEQ ID NO: 45, 46
pPs619C1310	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → TTT	S477F	SEQ ID NO: 35, 36
	CAG → AAA	Q481K	SEQ ID NO: 41, 42

Tabela 4

Sintase Recombinante	Substituição de ácido nucléico	Substituição de Aminoácido	Iniciadores
pPs619C1311	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → TTT	S477F	SEQ ID NO: 35, 36
	CAG → ATG	Q481M	SEQ ID NO: 43, 44
pPs619C1312	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → TTT	S477F	SEQ ID NO: 35, 36
	CAG → CGC	Q481R	SEQ ID NO: 45, 46
pPs619C1313	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → TAT	S477Y	SEQ ID NO: 37, 38
	CAG → AAA	Q481K	SEQ ID NO: 41, 42
pPs619C1314	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → TAT	S477Y	SEQ ID NO: 37, 38
	CAG → ATG	Q481M	SEQ ID NO: 43, 44
pPs619C1315	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → TAT	S477Y	SEQ ID NO: 37, 38
	CAG → CGC	Q481R	SEQ ID NO: 45, 46

Tabela 5

Sintase Recombinante	Substituição de ácido nucléico	Substituição de Aminoácido	Iniciadores
pPs619C1400	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → ACC	S325T	SEQ ID NO: 17, 18
	AGC → CGC	S477R	SEQ ID NO: 31, 32
	CAG → ATG	Q481M	SEQ ID NO: 43, 44
pPs619C1401	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → ACC	S325T	SEQ ID NO: 17, 18
	AGC → CGC	S477R	SEQ ID NO: 31, 32
	CAG → AAA	Q481K	SEQ ID NO: 41, 42
pPs619C1334	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → ACC	S325T	SEQ ID NO: 17, 18
	AGC → TTT	S477F	SEQ ID NO: 35, 36
	CAG → ATG	Q481M	SEQ ID NO: 43, 44
pPs619C1336	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → ACC	S325T	SEQ ID NO: 17, 18
	AGC → GGC	S477G	SEQ ID NO: 39, 40
	CAG → ATG	Q481M	SEQ ID NO: 43, 44
pPs619C1339	GAA → GAT	E130D	SEQ ID NO: 15, 16
	AGC → ACC	S325T	SEQ ID NO: 17, 18
	AGC → TTT	S477F	SEQ ID NO: 35, 36
	CAG → AAA	Q481K	SEQ ID NO: 41, 42

[APLICABILIDADE INDUSTRIAL]

[00062] Como descrito e provado acima, a presente invenção provê um copolímero compreendendo unidade de monômero de 4-hidroxibutirato e unidade de monômero de lactato ou um copolímero de unidade de monômero 4-hidroxibutirato, unidade de monômero de lactato e 3-hidroxiálcanoato. A presente invenção também provê um método para preparar o copolímero, em que o método compreende cultivar uma célula ou planta compreendendo o gene de enzima convertendo lactato e 3-hidroxiálcanoato em lactil-CoA e 3-hidroxiálconoil-CoA, respectivamente, gene de fosfotransbutilase, gene de butirato quinase e gene de poli-hidroxiálcanoato (PHA) sintase em conjunto. O copolímero da presente invenção é um polímero biodegradável sendo capaz de ser usado de modo utilizável em vez de plástico sintético convencional e o copolímero pode ser usado para fins médicos.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparar um copolímero compreendendo unidade de monômero de lactato e unidade de monômero de 4-hidroxibutirato,

caracterizado pelo fato de que compreende cultivar um microrganismo compreendendo

(a) um gene de enzima que converte lactato e 3-hidroxialcanoato em lactil-CoA e 3-hidroxialcanoil-CoA, respectivamente, em que o gene é o gene propionil-CoA transferase (pct) derivado de *Clostridium propionicum*,

(b) gene de fosfotransbutilase (Ptb) derivado de *Clostridium acetobutyricum*,

(c) gene de butirato quinase (buk) derivado de *Clostridium acetobutyricum*, e

(d) gene da poli-hidroxialcanoato (PHA) sintase phaCl_{pS6-19} derivado de *Pseudomonas* sp. 6-19.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o gene da PHA sintase tem a sequência de nucleotídeos de SEQ. ID No: 7 com qualquer substituição de nucleotídeo de

a) AGC, que é o códon no 973º, 974º e 975º nucleotídeo da SEQ. ID No: 7, para ACC, ACT, ACA ou ACG; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para ATG,

b) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para AAA ou AAG,

c) AGC, que é o códon no 973º, 974º e 975º nucleotídeo de SEQ. ID No: 7, para ACC, ACT, ACA ou ACG; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para AAA ou AAG,

d) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para ATG,

e) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para CGC, CGT, CGA, CGG, AGA ou AGG,

f) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 973º, 974º e 975º nucleotídeo da SEQ. ID No: 7, para ACC, ACT, ACA ou ACG; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para ATG,

g) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 973º, 974º e 975º nucleotídeo da SEQ. ID No: 7, para ACC, ACT, ACA ou ACG; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para AAA ou AAG,

h) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da SEQ. ID No: 7, para CGC, CGT, CGA, CGG, AGA ou AGG; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para AAA ou AAG,

i) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da

SEQ. ID No: 7, para CGC, CGT, CGA, CGG, AGA ou AGG; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para ATG,

j) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da

SEQ. ID No: 7, para CGC, CGT, CGA, CGG, AGA ou AGG; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para CGC, CGT, CGA, CGG, AGA ou AGG,

k) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da

SEQ. ID No: 7, para CAT ou CAC; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para AAA ou AAG,

l) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da

SEQ. ID No: 7, para CAT ou CAC; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para ATG,

m) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da

SEQ. ID No: 7, para CAT ou CAC; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para CGC, CGT, CGA, CGG, AGA ou AGG;

n) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da SEQ. ID No: 7, para TTT ou TTC; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para AAA ou AAG,

o) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeo da SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da SEQ. ID No: 7, para TTT ou TTC; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para ATG,

p) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da SEQ. ID No: 7, para TTT ou TTC; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para CGC, CGT, CGA, CGG, AGA ou AGG,

q) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da SEQ. ID No: 7, para TAT ou TAC; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para AAA ou AAG,

r) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da SEQ. ID No: 7, para TAT ou TAC; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para ATG,

s) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da

SEQ. ID No: 7, para TAT ou TAC; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para CGC, CGT, CGA, CGG, AGA ou AGG,

t) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 973º, 974º e 975º nucleotídeo da SEQ.

ID No: 7, para ACC, ACT, ACA ou ACG;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da

SEQ. ID No: 7, para CGC, CGT, CGA, CGG, AGA ou AGG; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para ATG,

u) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 973º, 974º e 975º nucleotídeo da SEQ.

ID No: 7, para ACC, ACT, ACA ou ACG;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da

SEQ. ID No: 7, para CGC, CGT, CGA, CGG, AGA ou AGG; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para AAA ou AAG,

v) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da

SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 973º, 974º e 975º nucleotídeo da SEQ.

ID No: 7, para ACC, ACT, ACA ou ACG;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da

SEQ. ID No: 7, para TTT ou TTC; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para ATG,

w) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 973º, 974º e 975º nucleotídeo da SEQ. ID No: 7, para ACC, ACT, ACA ou ACG;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da SEQ. ID No: 7, para GGC, GGT, GGA ou GGG; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para ATG, ou

x) GAA, que é o códon no 388º, 389º e 390º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para GAT ou GAC;

AGC, que é o códon no 973º, 974º e 975º nucleotídeo da SEQ. ID No: 7, para ACC, ACT, ACA ou ACG;

AGC, que é o códon no 1429º, 1430º e 1431º nucleotídeo da SEQ. ID No: 7, para TTT ou TTC; e

CAG, que é o códon no 1441º, 1442º e 1443º nucleotídeos da SEQ. ID No: 7, para AAA ou AAG,

e em que o gene de PHA sintase codifica os mutantes da PHA sintase da sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 8 tendo mutações de

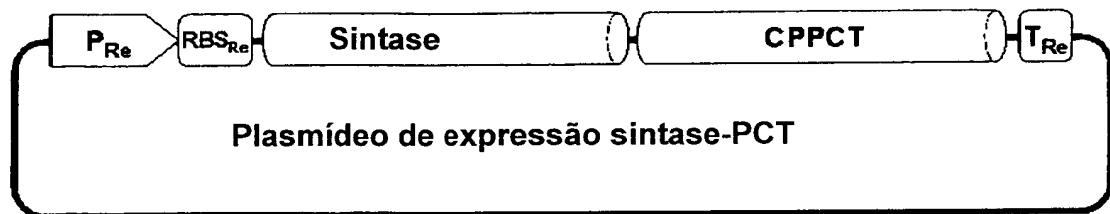
- a) S325T e Q481M;
- b) E130D e Q481K;
- c) S325T e Q481K;
- d) E130D e Q481M;
- e) E130D e Q481R;
- f) E130D, S325T e Q481M;
- g) E130D, S325T e Q481K;
- h) E130D, S477R e Q481K;
- i) E130D, S477R e Q481M;

- j) E130D, S477R e Q481R;
- k) E130D, S477H e Q481K;
- l) E130D, S477H e Q481M;
- m) E130D, S477H e Q481R;
- n) E130D, S477F e Q481K;
- o) E130D, S477F e Q481M;
- p) E130D, S477F e Q481R;
- q) E130D, S477Y e Q481K;
- r) E130D, S477Y e Q481M;
- s) E130D, S477Y e Q481R;
- t) E130D, S325T, S477R e Q481M;
- u) E130D, S325T, S477R e Q481K;
- v) E130D, S325T, S477F e Q481M;
- w) E130D, S325T, S477G e Q481M; ou
- x) E130D, S325T, S477F e Q481K.

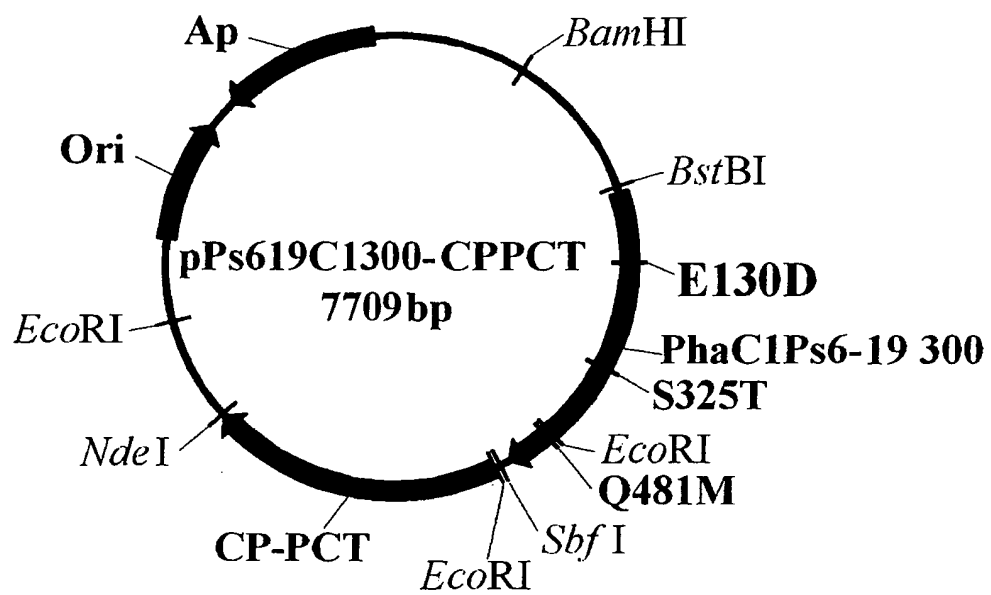
3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é *E. coli*.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o cultivo é realizado em um meio de cultura compreendendo pelo menos um selecionado dentre o grupo consistindo de 4-hidroxibutirato, 3-hidroxipropionato e 3-hidroxibutirato.

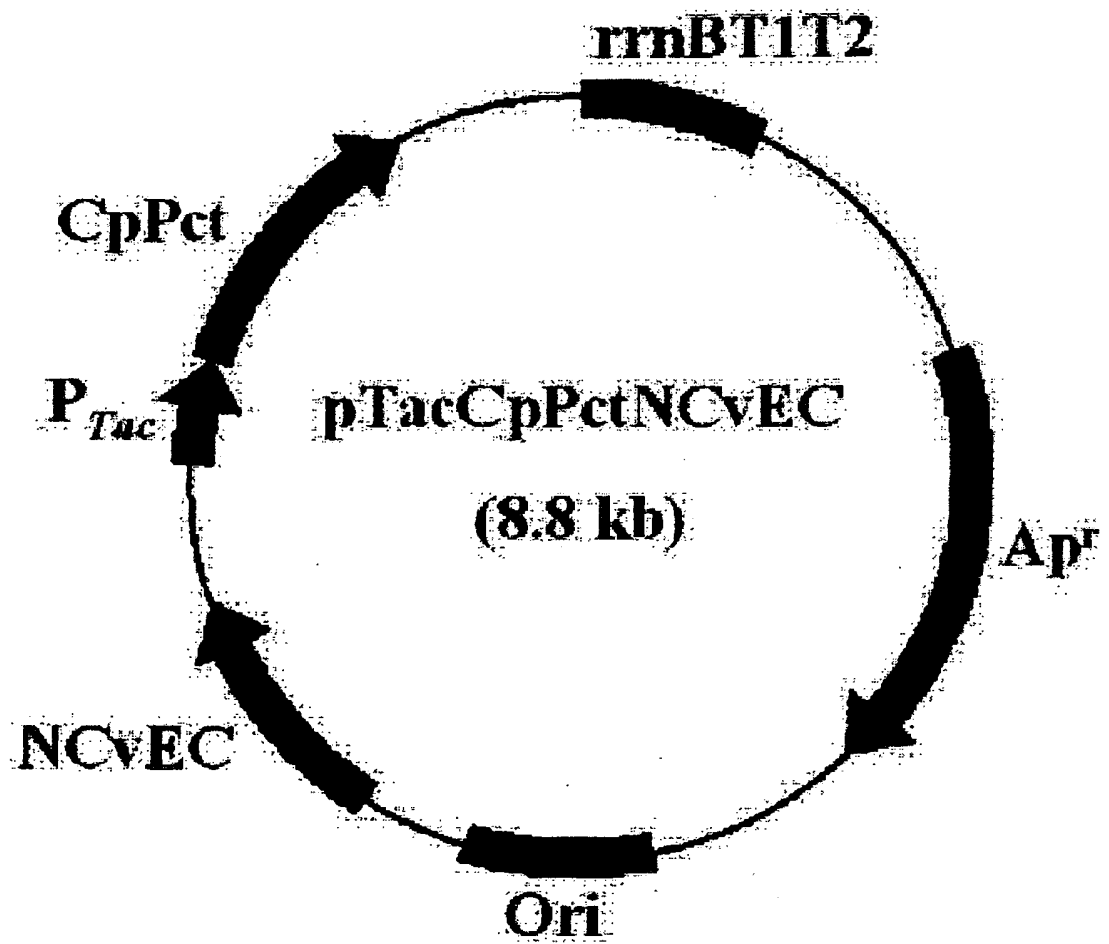
[FIG. 1]



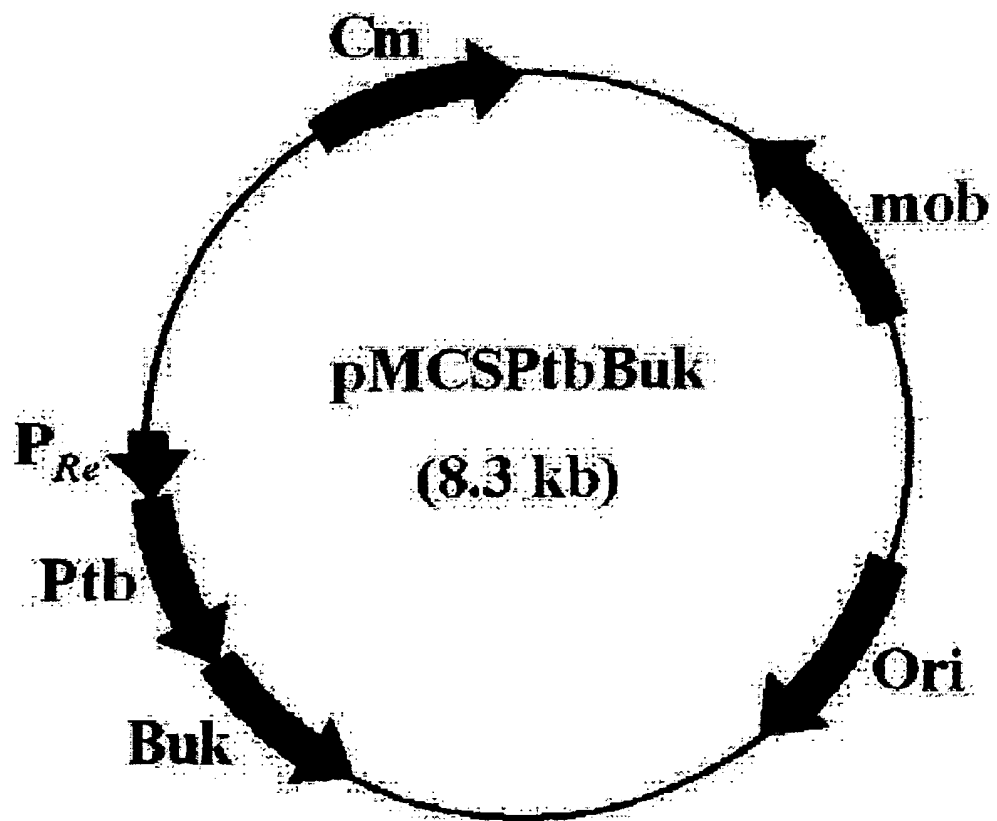
[FIG. 2]



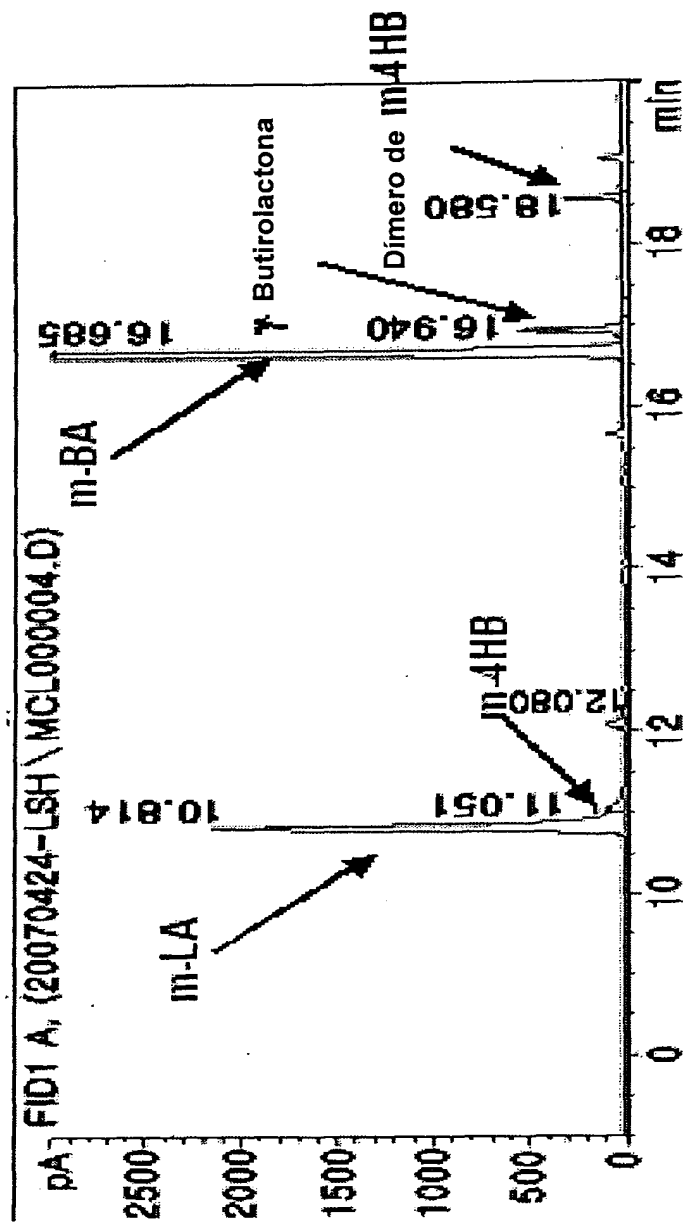
[FIG. 3]



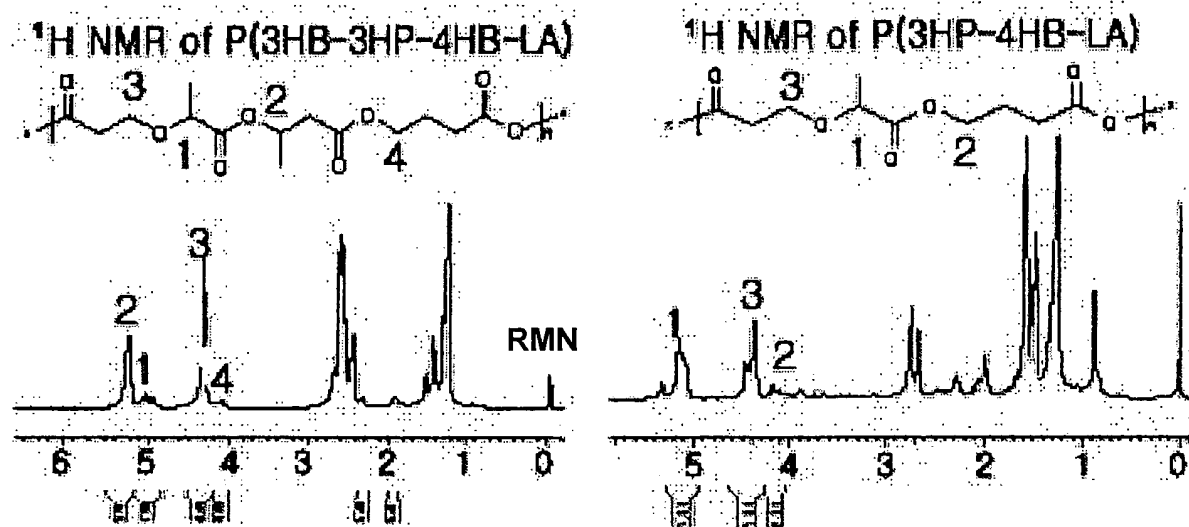
[FIG. 4]



[FIG. 5]



[FIG. 6]



[FIG. 7]

