



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0709142-7 A2**

(22) Data de Depósito: 23/03/2007
(43) Data da Publicação: 28/06/2011
(RPI 2112)



(51) *Int.Cl.:*
C12P 7/42 2006.01
C12P 7/52 2006.01
C12N 9/90 2006.01

(54) Título: **MÉTODO PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS DE 2-HIDRÓXI-2-METILA**

(30) Prioridade Unionista: 24/03/2006 DE 10 2006 014 167.9,
12/04/2006 DE 10 2006 017 760.6, 12/04/2006 DE 10 2006 017 760.6

(73) Titular(es): Evonik Röhm GmbH

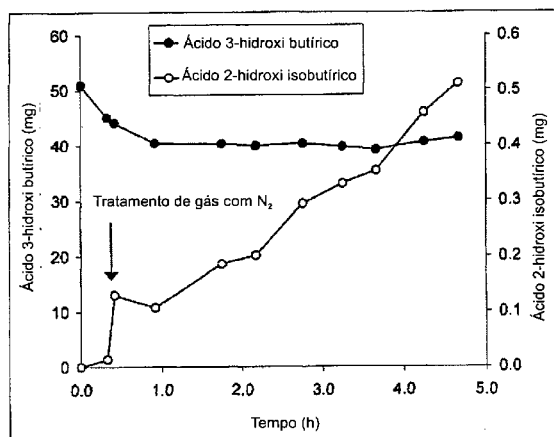
(72) Inventor(es): Roland H. Müller, Thore Rohwerder

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007052830 de 23/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/110394 de 04/10/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS DE 2-HIDRÓXI-2-METILA. A presente invenção refere-se a um método para a produção enzimática de ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos a partir de ácidos carboxílicos de 3-hidróxi, em que um ácido 3-hidróxi carboxílico é produzido em uma solução de reação aquosa e/ou é adicionado a essa solução de reação e é incubado. A solução de reação aquosa compreende uma unidade que tem atividade de mutase de 3-hidróxi-carboxilato-CoA que tem ambas as atividades de produção de éster de 3-hidróxi-carbonil-CoA e de isomerização de éster de 3-hidróxi-carbonil-CoA e converte o ácido 3-hidróxi carboxílico no ácido 2-hidróxi-2-metil carboxílico de que é isolado como ácido, ou na forma de seus sais. Em uma modalidade preferida, a unidade tendo atividade de mutase de 3-hidróxi-carboxilato-CoA é uma unidade que inclui uma mutase dependente de cobalamina isolada e, onde apropriado, uma enzima ou sistema de enzimas produzindo éster de 3-hidróxi-carbonil-CoA ou um microrganismo que os inclui. A invenção preferivelmente refere-se a um processo biotecnológico para produzir ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos, onde os microrganismos que têm as atividades desejadas são cultivados em um sistema aquoso com a ajuda de produtos naturais simples e convertem ésteres de 3-hidro-carbonil-CoA formados intracelularmente em ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos correspondentes. A invenção de maneira semelhante abrange a produção de ácidos 2-metil carboxílicos não saturados, onde os ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos obtidos são convertidos por desidratação nos ácidos 2-metil carboxílicos não-saturados correspondentes (ácido metacrílico e homólogos superiores).



020080145 404
24/11/2009

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS DE 2-HIDRÓXI-2-METILA".

A presente invenção refere-se a um método para a produção enzimática de ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos de ácidos 3-hidróxi carboxílicos, em que um ácido 3-hidróxi carboxílico é produzido em uma solução de reação aquosa e/ou é adicionado a essa solução de reação e é incubado. A solução de reação aquosa compreende uma unidade que tem atividade de mutase de 3-hidróxi-carboxilato-CoA a qual tem ambas as atividades de produção de éster 3-hidróxi-carbonil-CoA e isomerização de éster 3-hidróxi-carbonil-CoA, e converte o ácido 3-hidróxi carboxílico no ácido 2-hidróxi-2-metil carboxílico correspondente, que é isolado como ácido ou na forma de seus sais. Em uma modalidade preferida, a unidade que tem atividade de mutase de 3-hidróxi-carboxilato-CoA compreende uma mutase dependente de cobalamina isolada e, onde apropriado, uma enzima ou sistema de enzimas que produzem éster 3-hidróxi-carbonil-CoA, ou é um microrganismo incluindo-os. A invenção preferivelmente refere-se a um processo biotecnológico para produzir ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos, onde os microrganismos que têm a atividade de mutase desejada são cultivados em um sistema aquoso com o auxílio de produtos naturais simples, e ésteres 3-hidróxi-carbonil-CoA intracelularmente formados são convertidos nos ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos correspondentes. A invenção de forma semelhante abrange a produção de ácidos 2-metil carboxílicos não saturados, onde os ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos obtidos são convertidos pela desidratação nos ácidos 2-metil carboxílicos não saturados correspondentes (ácido metacrílico e homólogos superiores).

Em uma modalidade preferida da invenção, o microrganismo de produção de tioéster 3-hidróxi-carbonil-CoA e o de isomerização de tioéster 3-hidróxi-carbonil-CoA usado é a cepa HCM-10 (DSM 18028).

Ácido metacrílico e ácidos 2-metil carboxílicos homólogos não saturados são largamente usados na produção de folhas de vidro de acrílico, produtos moldados por injeção, revestimentos e muitos outros produtos.

Uma pluralidade de processos para a produção do ácido metacrílico e seus homólogos tem sido descrita. Entretanto, a vasta maioria da produção comercial no mundo inteiro está baseada em um método de hidrolisar os sulfatos de amida de ácido metacrílico e seus homólogos, que são produzidos a partir das 2-hidróxi nitrilas correspondentes (W. Bauer, "Methacrylic acid and derivatives", em: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5ª edition, editores: B. Elvers, S. Hawkins, G. Schulz, VCH, New York, 1990, Vol. A16, pp. 441-452; A. W. Gross, J. C. Dobson, "Methacrylic acid and derivatives", in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4th edition, editors: J. I. Kroschwitz, M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, New York, 1995, Vol. 16, pp. 474-506). Esse método requer, por exemplo, cerca de 1,6 kg de ácido sulfúrico para a produção de 1 kg de ácido metacrílico. Por este motivo, métodos alternativos para a produção comercial de ácido metacrílico sem a necessidade de recuperar o ácido sulfúrico (e altos custos de energia associados a isso) podem ser vantajosos.

US 3.666.805 e US 5.225.594 descreveram a conversão química do ácido 2-hidróxi isobutírico em ácido metacrílico. Isto compreende desidratar o ácido 2-hidróxi isobutírico usando óxidos de metal, hidróxidos de metal, resinas de troca de íons, alumina, dióxido de silicone, aminas, fosfinas, alcóxidos de metal de álcali e carboxilatos de metal de álcali. As temperaturas de reação usuais são entre 160°C e 250°C. Esse método tornou possível ao ácido metacrílico um rendimento de até 96%.

Um método alternativo para a produção de ácido metacrílico e seus homólogos baseia-se na hidrólise de 2-hidróxi nitrilas aos ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos correspondentes, utilizando enzimas que hidrolisam nitrilas. Estas últimas são a nitrilase ou uma combinação de nitrila hidratase e amidase (A. Banerjee, R. Sharma, U. C. Banerjee, 2002, "The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects", Appl. Microbiol. Biotechnol., 60:33-44. Esse método é protegido por uma pluralidade de patentes (US 6,582,943 B1). Uma séria desvantagem desse método reside na instabilidade das nitrilas na faixa de pH neutro necessária para uma atividade eficiente das enzimas que hidrolisam nitrilas. A decomposição das nitrilas

na mistura da reação resulta em acúmulo de cetonas e de cianetos, ambos os quais inibem as atividades das enzimas envolvidas na hidrólise de nitrilas.

Uma desvantagem geral de ambos os métodos, isto é, do método atualmente predominante, baseado em sulfatos de amida, e do método enzimático de hidrólise de nitrilas, é a necessidade de 2-hidróxi nitrilas. Estas últimas devem ser preparadas, em primeiro lugar, a partir de reagentes prejudiciais para o ambiente, isto é, cetonas e cianeto.

Por essa razão, métodos para a produção de ácido metacrílico e seus homólogos, que se baseiam em reagentes simples e benignos para o ambiente, seriam vantajosos.

Por conseguinte, a invenção teve por objetivo pesquisar possibilidades alternativas de produzir ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos e prover métodos que se baseiem, quando possível, na aplicação de reagentes simples e benignos para o ambiente, que consumam pouca energia e que produzam poucos produtos de degradação.

Esse objetivo é alcançado por um método enzimático para a produção de ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos a partir de ácidos 3-hidróxi carboxílicos. De acordo com a invenção, o dito ácido 3-hidróxi carboxílico é produzido em e/ou adicionado a uma solução de reação aquosa, que apresenta uma unidade exibindo atividade de 3-hidróxi-carboxilato-CoA mutase. Uma unidade exibindo atividade de 3-hidróxi-carboxilato-CoA mutase significa, para o propósito da invenção, uma unidade compreendendo uma mutase dependente de cobalamina e, onde apropriado, uma enzima produtora de éster de 3-hidróxi-carbonil-CoA ou um sistema enzimático ou um sistema biológico que as compreende ou que as produz, que apresentam atividade de 3-hidróxi-carboxilato-CoA mutase e exibem atividade tanto de produção de éster de 3-hidróxi-carbonil-CoA quanto de isomerização de éster de 3-hidróxi-carbonil-CoA. Após incubação, o ácido 2-hidróxi-2-metil carboxílico correspondentemente convertido é então isolado na forma de ácido ou na forma de seus sais.

A invenção refere-se preferivelmente a um processo biotecnológico para a produção de ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos com o uso de

microrganismos. Os ditos microrganismos habitualmente possuem atividade de síntese de éster de 3-hidróxi-carbonil-CoA e são capazes de produzir ou compreender essa mutase dependente de cobalamina e, devido à atividade da 3-hidróxi-carboxilato-CoA mutase, são capazes de converter intracelularmente ésteres de 3-hidróxi-carbonil-CoA formados a partir de produtos naturais simples (a partir de reagentes tais como, por exemplo, açúcares e/ou álcoois e/ou ácidos orgânicos e seus derivados) nos ésteres de 2-hidróxi-2-metil-carbonil CoA correspondentes.

O método da invenção caracteriza-se, em particular, pelo fato de que os microrganismos que produzem ou que compreendem a mutase dependente de cobalamina e que exibem atividade de 3-hidróxi-carboxilato-CoA mutase são usados em sistemas aquosos para conversão de ácidos 3-hidróxi carboxílicos no ácido 2-hidróxi-2-metil carboxílico correspondente.

Em uma variante preferida do método, microrganismos que compreendem atividade de 3-hidróxi-carboxilato-CoA mutase e que exibem atividade de produção de tioéster de 3-hidróxi-carbonil-CoA e de isomerização de tioéster de 3-hidróxi-carbonil-CoA são cultivados em um sistema aquoso com matérias-primas renováveis ou produtos de degradação que derivam do consumo de matérias-primas renováveis, como fontes de carbono e de energia. No processo, os tioésteres de 3-hidróxi-carboxilato-CoA formados intracelularmente são convertidos nos ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos correspondentes. A reação é efetuada preferivelmente com a adição de ácido 3-hidróxi carboxílico externo. O ácido 2-hidróxi-2-metil carboxílico correspondente é, a seguir, isolado como ácido ou na forma de seus sais.

Esse novo método de biotecnologia, que utiliza a produção de ácidos 3-hidróxi carboxílicos a partir de produtos naturais simples e sua isomerização a ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos, é capaz de solucionar o problema especificado acima.

Em uma modalidade preferida da invenção, o método compreende as seguintes etapas:

(a) ácidos 3-hidróxi carboxílicos são produzidos a partir de produtos naturais simples e, a seguir, convertidos em ácidos 2-hidróxi-2-metil

carboxílicos, em um sistema biológico apropriado, que possui atividade de síntese de ésteres de 3-hidróxi-carbonil-CoA e atividade de mutase, e

(b) os ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos são isolados na forma de ácidos livres ou seus sais correspondentes.

5 Os ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos obtidos dessa maneira podem ser usados de modo vantajoso para produzir ácidos isoalquenóicos C2 e C3-insaturados (ácido metacrílico e seus homólogos), possivelmente por desidratação dos ácidos produzidos em (a) e (b) ou seus sais correspondentes. Essas reações são descritas abaixo:

10 - produtos naturais simples (por exemplo, matérias-primas renováveis ou produtos de degradação que derivam do consumo de matérias-primas renováveis, tais como, por exemplo, açúcares, ácidos orgânicos ou álcoois) → ácidos 3-hidróxi carboxílicos → ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos (por exemplo, pela cepa HCM-10)

15 - ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos → ácido metacrílico e homólogos (por exemplo, na presença de NaOH e a uma temperatura de 185°C).

As condições da reação (pH, concentração de íons, necessidades de oxigênio/dióxido de carbono, oligoelementos, temperaturas e similares) são naturalmente escolhidas aqui, de tal maneira que os microrganismos sejam capazes de converter idealmente ácidos 3-hidróxi carboxílicos em ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos. Nessas condições do processo, a mutase dependente de cobalamina pode apresentar maior estabilidade e eficácia no microambiente natural, isto é, no interior da célula, do que a enzima isolada. Além disso, a propagação celular e, portanto, um aumento na concentração de mutase podem ser possíveis em condições apropriadas. A conversão enzimática por meio de microrganismos constitui, portanto, onde
25 apropriado, uma importante vantagem no que concerne à confiabilidade, automatização e simplicidade, bem como à qualidade e ao rendimento do produto final do método.
30

Para a conversão enzimática de acordo com a invenção de ácidos 3-hidróxi carboxílicos em ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos, é também

possível introduzir na solução da reação a unidade exibindo atividade de 3-hidróxi-carboxilato-CoA mutase, isto é, uma mutase dependente de cobalamina, preferivelmente em combinação com uma atividade de síntese de éster de CoA, em uma forma purificada, concentrada e/ou isolada, sendo possível que as enzimas sejam de origem natural, por exemplo. Naturalmente, as enzimas podem ser enzimas produzidas de modo recombinante a partir de um organismo geneticamente modificado.

Para a finalidade da invenção, as enzimas são usadas no método da invenção como catalisadores, tanto na forma de células microbianas intactas quanto na forma de células microbianas permeabilizadas. Outros usos possíveis são aqueles na forma de componentes (um ou mais) a partir de extratos de células microbianas, mas também em uma forma parcialmente purificada ou purificada. Onde apropriado, outras enzimas envolvidas na síntese de éster de CoA, como, por exemplo, CoA transferase ou CoA sintetases, são usadas de acordo com a invenção. Os catalisadores enzimáticos podem ser imobilizados ou ligados a um material de suporte dissolvido ou não-dissolvido.

Em uma variante de modalidade preferida, compartimentos de células particulares ou partes dos mesmos, separados uns dos outros ou combinados, isto é, estruturas de carboidratos, lipídios ou proteínas e/ou peptídeos e também ácidos nucleicos, que são capazes de influenciar a unidade exibindo atividade de mutase de maneira positiva ou negativa, podem ser combinados ou separados. Para utilizar essa influência de modo intencional, por exemplo, são preparados extratos brutos a partir dos microrganismos de uma maneira específica, por exemplo, onde os extratos são centrifugados, onde apropriado, para ser possível efetuar uma reação da invenção com o sedimento ou o sobrenadante.

Os ácidos 3-hidróxi carboxílicos (por exemplo, ácido 3-hidróxi butírico) ou, mais especificamente, seu CoA tioéster intracelular 3-hidróxi-carbonil-CoA, podem ser prontamente produzidos a partir de produtos naturais simples por um grande número de cepas de bactérias. Esses ácidos são os blocos/monômeros básicos de construção para a substância bacteriana

comum de armazenamento de carbono e energia, o poli-3-hidroxi-3-oxoalcanoato. Os rearranjos do carbono dentro do esqueleto dos ácidos carboxílicos também são comuns em sistemas bacterianos, bem como em outros sistemas biológicos. Todavia, nenhum sistema biológico para a conversão de ésteres de 3-hidróxi-carbonil-CoA nos ésteres de 2-hidróxi-2-metil-carbonil-CoA correspondentes havia sido previamente identificado. A invenção baseia-se no achado surpreendente de que sistemas com atividade de mutase dependente de cobalamina possuem ambas as propriedades.

Os microrganismos que compreendem mutases dependentes de cobalamina incluem, por exemplo, *Methylibium petroleiphilum* PM1, *Methylibium* sp. R8 (coleção de cepas UFZ, Leipzig, Alemanha), a cepa β -proteobacteriana HCM-10, *Xanthobacter autotrophicus* Py2, *Rhodobacter sphaeroides* (ATCC17029) ou *Nocardioideis* sp. JS614.

Foi encontrado um sistema biológico preferivelmente apropriado na cepa HCM-10. A dita cepa foi depositada, de acordo com o Tratado de Budapeste, no depósito de microrganismos para as finalidades de procedimento de patentes no Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH [Coleção de microrganismos e culturas celulares da Alemanha], Brunswick, Alemanha, sob o No. DSM 18028 em 13.03.2006.

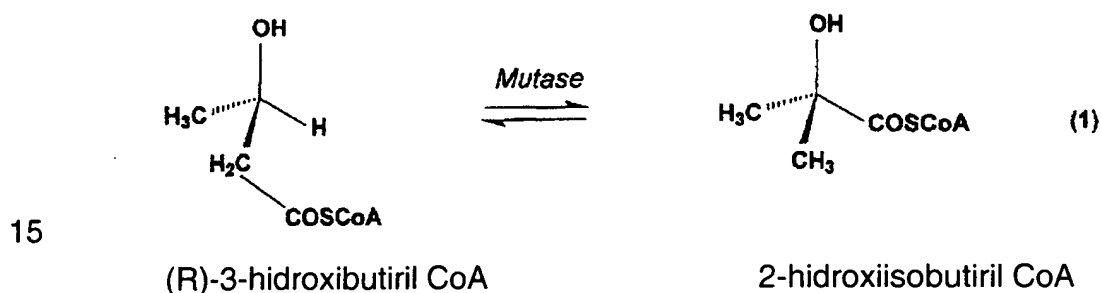
Usando esse sistema biológico preferido, foi possível obter um rendimento particularmente bom de ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos, em particular de ácido 2-hidróxi isobutírico. Entretanto, a conversão enzimática por microrganismos não se limita, de modo algum, a essa cepa. Quaisquer organismos capazes de converter ácidos 3-hidróxi carboxílicos em ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos podem ser usados de acordo com a invenção.

Eles podem ser microrganismos que, em primeiro lugar, possuem o mesmo gene ou produto gênico ou que, em segundo lugar, apresentam um gene análogo, resultando em produtos gênicos exibindo uma atividade similar ou análoga. Isto é, as atividades de 3-hidróxi-carbonil-CoA mutase de outra origem são igualmente cobertas pela invenção. A invenção também inclui sistemas transformados que exibem uma atividade de 3-hidróxi-carbonil-CoA mutase ou atividade similar como cepa HCM-10 ou a de

outra origem.

Isso pode incluir mutantes, geneticamente modificados e modificações isoladas dos microrganismos, por exemplo, organismos que exibem a atividade desejada de mutase dependente de cobalamina, devido à introdução de uma seqüência de nucleotídeos de codificação da mutase.

O sistema biológico preferivelmente usado (cepa HCM-10 - DSM 18028) produz ésteres de 3-hidróxi-carbonil-CoA na forma de tioésteres a partir de produtos naturais simples, tais como açúcares e/ou ácidos orgânicos e/ou álcoois e seus derivados. No sistema preferido usado aqui, os ésteres de 3-hidróxi-carbonil-CoA são convertidos pela mutase de rearranjo de esqueleto de carbonos dependente de cobalamina em ésteres de 2-hidróxi-2-metil-carbonil-CoA, conforme descrito pelo exemplo do caso de (*R*)-3-hidróxi-butil CoA na equação 1. O tioéster de CoA é hidrolisado no sistema, e o ácido é secretado no meio de cultura.



No método da invenção, dá-se preferência ao uso, como catalisadores enzimáticos, das cepas de microrganismos que compreendem mutases dependentes de cobalamina, HCM-10 (DSM 18028), *Xanthobacter autotrophicus* Py2, *Rhodobacter sphaeroides* (ATCC17029) ou *Nocardioide* sp. JS614, seus extratos brutos ou partes. As cepas usadas de acordo com a invenção produzem preferivelmente as proteínas com as seqüências SEQ ID NO: 2 e/ou SEQ ID NO: 4 ou compreendem as seqüências de ácidos nucleicos SEQ ID NO: 1 e/ou SEQ ID NO: 3 (HCM-10), as proteínas com as seqüências SEQ ID NO: 5 e/ou SEQ ID NO: 6, ou compreendem as seqüências de ácidos nucleicos SEQ ID NO: 7 e/ou SEQ ID NO: 8 (*Xanthobacter autotrophicus* Py2), as proteínas com as seqüências SEQ ID NO: 9 e/ou SEQ ID NO: 10, ou compreendem as seqüências de ácidos nucleicos SEQ

ID NO: 11 e/ou SEQ ID NO: 12 (*Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17029) ou as proteínas com as seqüências SEQ ID NO: 13 e/ou SEQ ID NO: 14, ou compreendem as seqüências de ácidos nucléicos SEQ ID NO: 15 e/ou SEQ ID NO: 16 (*Nocardioides* sp. JS614). Para as finalidades da invenção, as
5 ditas proteínas também podem ser usadas em uma forma concentrada, isolada ou produzida por síntese.

Em uma variante adicional preferida da modalidade da invenção, os catalisadores enzimáticos, em particular microrganismos, extratos brutos, partes dos mesmos e/ou as enzimas concentradas ou isoladas são usados
10 em uma forma imobilizada. A imobilização torna as enzimas, as organelas celulares e as células insolúveis e limitadas ao espaço da reação. Por exemplo, podem ser imobilizadas em uma matriz de polímero (por exemplo, alginato, álcool polivinílico ou géis de poliacrilamida). Podem ser também imobilizadas em materiais de suporte dissolvidos ou não-dissolvidos (por
15 exemplo, celite) para facilitar a recuperação e a reutilização dos catalisadores. Métodos de imobilização de células em uma matriz de polímero ou em um suporte dissolvido ou não-dissolvido são conhecidos daquele versado na técnica e foram previamente descritos de modo detalhado. As atividades enzimáticas podem ser igualmente isoladas das células microbianas. A se-
20 guir, podem ser usadas diretamente como catalisadores ou em uma forma imobilizada em uma matriz de polímero ou em um suporte dissolvido ou não-dissolvido. Os métodos necessários para isso são conhecidos daquele versado na técnica e, por exemplo, descritos em *Methods in Biotechnology*, Vol. 1: *Immobilization of enzymes and cells*, editor: G. F. Bickerstaff, Humana
25 Press, Totowa, New Jersey, 1997.

Os ácidos 3-hidróxi carboxílicos são convertidos em ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos preferivelmente dentro da estrutura de um processo contínuo que pode ser executado em um reator de fluxo, no qual ocorrem crescimento microbiano e, portanto, formação de produtos. Entretanto,
30 um processo contínuo também pode significar qualquer sistema de células em crescimento e enzimas catalisadoras, que é suprido com solução de nutrientes e a partir do qual se remove a solução de cultura, incluindo ácido 2-

hidróxi-2-metil carboxílico enzimaticamente formado. De acordo com a invenção, o processo também pode ser executado como processo semicontínuo ou de batelada.

Como foi explicado acima, o ácido 3-hidróxi carboxílico, que é o material de partida para o ácido 2-hidróxi-2-metil carboxílico, é produzido preferivelmente por conversão enzimática de carboidratos e/ou ácidos orgânicos e/ou álcoois ou seus derivados. No contexto da invenção, além da mutase dependente de cobalamina, é feito o uso, onde apropriado, de enzimas de síntese de ésteres de CoA adicionais, que estão presentes ou que são adicionadas ao microrganismo. Isso envolve a conversão de hidrocarbonetos e/ou carboidratos e/ou ácidos orgânicos e/ou álcoois ou derivados dos mesmos no ácido 3-hidróxi carboxílico e do ácido 3-hidróxi carboxílico no ácido 2-hidróxi-2-metil carboxílico em um processo de uma única etapa, isto é, a conversão dos substratos de partida em ácido 3-hidróxi carboxílico e as reações de conversão enzimáticas do ácido 3-hidróxi carboxílico no ácido 2-hidróxi-2-metil carboxílico correspondente são realizadas ao mesmo tempo ou com uma ligeira diferença de tempo em uma e na mesma solução da reação.

Em uma modalidade muito particular da invenção, um substrato com um radical terc-butila como fonte de carbono e fonte de energia é usado para cultura, dando-se preferência ao álcool terc-butilico como única fonte de carbono e de energia em um meio basal.

O método da invenção é preferivelmente útil para a produção de ácido 2-hidróxi-2-metil propanóico (ácido 2-hidróxi isobutírico). A produção preferida de ácido 2-hidróxi isobutírico é adicionalmente caracterizada pela adição externa de ácido 3-hidróxi butírico.

O método foi realizado em condições aeróbicas, preferivelmente com o uso de células intactas, ou em condições não-aeróbicas, por exemplo, mediante tratamento de gás com nitrogênio, preferivelmente quando são usados extratos com enzimas purificadas.

A invenção também refere-se a moléculas de ácidos nucleicos que codificam a enzima apresentando a atividade de mutase dependente de

cobalamina, selecionadas a partir do grupo consistindo em:

a) moléculas de ácidos nucléicos que codificam uma proteína compreendendo as seqüências de aminoácidos indicadas em Seq. No. 2 e/ou Seq. No. 4;

5 b) moléculas de ácidos nucléicos compreendendo a seqüência de nucleotídeos descrita em Seq. No. 1 e/ou Seq. No. 3.

Uma enzima da invenção demonstrou ser preferivelmente uma proteína heterodimérica que compreende as subunidades descritas em Seq. Nº 2 e Seq. Nº 4 e que, portanto, possui excelente atividade enzimática.

10 Uma molécula de ácido nucléico pode ser uma molécula de DNA, preferivelmente uma molécula de cDNA ou de DNA genômico e/ou de RNA. Tanto os ácidos nucléicos quanto as proteínas podem ser isolados de fontes naturais, preferivelmente a partir de DSM 18028, mas também, por exemplo, de *Methylibium petroleiphilum* PM1, *Methylibium* sp. R8 (coleção
15 de cepas UFZ Leipzig, Alemanha), *Xanthobacter autotrophicus* Py2, *Rhodobacter sphaeroides* (ATCC17029) ou Nocardioides sp. JS614, ou podem ser sintetizados por métodos conhecidos.

Mutações podem ser produzidas nas moléculas de ácidos nucléicos usadas de acordo com a invenção através de técnicas de biologia
20 molecular conhecidas por elas próprias, possibilitando, assim, a síntese de enzimas adicionais com propriedades análogas ou similares, que são igualmente usadas no método da invenção. As mutações podem ser mutações por deleção, que resultam em enzimas truncadas. Enzimas modificadas com propriedades similares ou análogas podem ser igualmente geradas através
25 de outros mecanismos moleculares, tais como, por exemplo, inserções, duplicações, transposições, fusão de genes, troca de nucleotídeos ou transferência de genes entre diferentes cepas de microrganismos.

Essas moléculas de ácidos nucléicos podem ser identificadas e isoladas usando as moléculas de ácidos nucléicos ou partes das mesmas.
30 As moléculas que hibridizam com as moléculas de ácidos nucléicos também compreendem fragmentos, derivados e variantes alélicas das moléculas de ácidos nucléicos descritas acima, que codificam uma enzima passível de ser

usada de acordo com a invenção. Os fragmentos aqui significam partes de moléculas de ácidos nucleicos, os quais são longos o suficiente para codificar a enzima descrita. Os derivados significam seqüências dessas moléculas, que diferem das seqüências das moléculas de ácidos nucleicos descritas acima em uma ou mais posições, mas que apresentam um alto grau de homologia com essas seqüências. A homologia aqui significa uma identidade de seqüência de pelo menos 40%, em particular uma identidade de pelo menos 60%, preferivelmente de mais de 80% e em particular preferivelmente de 90%, 95%, 97% ou 99%, em nível do ácido nucleico. As enzimas codificadas aqui apresentam uma identidade de seqüência com as seqüências de aminoácidos especificadas de pelo menos 60%, preferivelmente de pelo menos 80%, em particular preferivelmente de pelo menos 95%, muito particularmente de preferência de pelo menos 99%, em nível de aminoácidos. Os desvios aqui podem constituir o resultado de deleção, substituição, inserção ou recombinação. Podem ser variações de ocorrência natural, por exemplo, seqüências de outros organismos, ou outras mutações que podem ocorrer de modo natural ou por mutagenese específica (raios UV, raios X, agentes químicos ou outros). As variantes também podem ser seqüências produzidas de modo sintético. Essas variantes possuem características comuns particulares, tais como, por exemplo, atividade enzimática, concentração de enzima ativa, subunidades, grupos funcionais, reatividade imunológica, conformação e/ou propriedades físicas, tais como comportamento de migração na eletroforese em gel, comportamento cromatográfico, solubilidade, coeficientes de sedimentação, pH ótimo, temperatura ótima, propriedades espectroscópicas, estabilidade e/ou outras características.

Além disso, a invenção também se refere às novas proteínas com a seqüência No. 2 e 4 e a uma proteína heterodimérica, que compreende a seqüência No. 2 e a seqüência No. 4 e seus homólogos de pelo menos 99%.

A SEQ ID NO: 1 descreve a seqüência de nucleotídeos de 1644 pb para a subunidade grande da mutase dependente de cobalamina da DSM 18028.

A SEQ ID NO: 2 descreve a seqüência de aminoácidos de 548 aa da subunidade grande da mutase dependente de cobalamina da DSM 18028.

5 A SEQ ID NO: 3 descreve 369 pb da seqüência parcial de nucleotídeos para a subunidade pequena da mutase dependente de cobalamina da DSM 18028.

A SEQ ID NO: 4 descreve a seqüência parcial de 123 aa da subunidade da mutase dependente de cobalamina da DSM 18028.

10 As SEQ ID NOS: 5 e 6 descrevem as seqüências de aminoácidos de 562 e 135 aa, respectivamente, de uma mutase dependente de cobalamina de *Xanthobacter autotrophicus* Py2.

As SEQ ID NOS: 7 e 8 descrevem os 1689 e 408 pb, respectivamente, da seqüência de nucleotídeos para as mutases dependentes de cobalamina de *Xanthobacter autotrophicus* Py2.

15 As SEQ ID NOS: 9 e 10 descrevem as seqüências de aminoácidos de 563 e 135 aa, respectivamente, de uma mutase dependente de cobalamina do *Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17029.

20 As SEQ ID NOS: 11 e 12 descrevem os 1692 e 408 pb, respectivamente, da seqüência de nucleotídeos para as mutases dependentes de cobalamina de *Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17029.

As SEQ ID NOS: 13 e 14 descrevem as seqüências de aminoácidos de 569 e 164 aa, respectivamente, de uma mutase dependente de cobalamina de *Nocardoides* sp. JS614.

25 As SEQ ID NOS: 15 e 16 descrevem os 1710 e 495 pb, respectivamente, da seqüência de nucleotídeos para as mutases dependentes de cobalamina de *Nocardoides* sp. JS614.

30 Os ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos produzidos de acordo com a invenção podem ser isolados através de tratamento do meio de cultura (após remoção de componentes não-dissolvidos, tais como células microbianas) por métodos anteriormente descritos. Os exemplos desses métodos são, entre outros, concentração, troca de íons, destilação, eletrodialise, extração e cristalização. O produto pode ser isolado na forma de sal ou (após

acidificação) na forma de ácido 2-hidróxi-2-metil carboxílico protonado.

Os ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos (ou seus sais correspondentes) podem ser desidratados por uma multiplicidade de métodos para produzir os ácidos 2-metil carboxílicos não-saturados correspondentes. Os ácidos isoalquenólicos C2-C3-não-saturados são produzidos pela desidratação do ácido 2-hidróxi-2-metil carboxílico produzido, usando os métodos conhecidos da técnica anterior. Os ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos podem ser desidratados usando óxidos de metais, hidróxidos de metais, resinas de troca iônica, alumina, dióxido de silício, aminas, fosfinas, alcóxidos de metais alcalinos e carboxilatos de metais alcalinos. As temperaturas da reação são habitualmente entre 160°C e 250°C. Assim, por exemplo, o ácido metacrílico é produzido pela desidratação do ácido 2-hidróxi isobutírico na presença de NaOH, a temperaturas de aproximadamente 185°C.

O ácido metacrílico produzido por esse processo e seus homólogos são apropriadamente aplicados em todo um conjunto de setores industriais, como, por exemplo, na forma de aditivos e revestimentos. Em contraste com os métodos anteriormente conhecidos, o método combina as vantagens desejadas de um processo em baixa temperatura, o uso de reagentes benignos para o ambiente e uma menor produção de produtos de degradação.

A invenção será descrita de maneira mais detalhada abaixo, com base em modalidades exemplares, mas não pretende limitar-se a isso.

Material e métodos

Catalisador enzimático microbiano

Células microbianas da cepa HCM-10 (DSM 18028), caracterizada por uma atividade de produção de éster de 3-hidróxi-carbonil-CoA e de isomerização de éster de 3-hidróxi-carbonil-CoA ou das subunidades protéicas com sequência No. 2 e No. 4 isoladas a partir disso.

Crescimento dos catalisadores enzimáticos microbianos

A cepa microbiana usada para a produção de ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos foi isolada conforme descrito aqui, adiante. As culturas de estoque ("stock cultures") são armazenadas em solução de glicerol de 20%

de concentração em nitrogênio líquido.

A cepa HCM-10 foi concentrada a partir de água de lençol freático em meio basal (Tabela 1) contendo álcool terc-butílico como única fonte de carbono e energia.

- 5 A cepa pertence filogeneticamente ao grupo Rubrivivax-Leptothrix.

Tabela 1

Meio basal (mg/L)			
NH ₄ Cl	761,4	Biotina	0,02
KH ₂ PO ₄	340,25	Ácido fólico	0,02
K ₂ HPO ₄	435,45	Piridoxina-HCl	0,1
CaCl ₂ × 6 H ₂ O	5,47	Tiamina-HCl	0,05
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	71,2	Riboflavina	0,05
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,44	Ácido nicotínico	0,05
MnSO ₄ × H ₂ O	0,615	DL-Ca-pantotenato	0,05
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,785	Ácido p-aminobenzóico	0,05
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,2	Ácido lipônico	0,05
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,252		
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	4,98	pH	7,0

- 10 A cepa HCM-10 foi desenvolvida de modo aeróbico sob as seguintes condições (Tabela 2) para ensaio da atividade de 3-hidróxi-carbonil-CoA mutase.

Tabela 2

Cepa	Substrato	Meio	Temperatura (°C)	Tempo (d)
HCM-10	Álcool terc-butílico (0,5 g/L)	Meio basal	25	7

- 15 As células foram usadas imediatamente após a sua colheita. As células intactas podem ser utilizadas sem pré-tratamento adicional, tal como, por exemplo, permeabilização. Além disso, as células podem ser usadas em uma forma permeabilizada (por exemplo, mediante tratamento com tolueno, detergentes ou por ciclos de congelamento-descongelamento) para melhorar

as taxas de difusão de substâncias para dentro e para fora das células.

A concentração de ácido 2-hidróxi isobutírico e de ácido 3-hidróxi butírico no líquido de cultura ou na mistura da reação foi determinada por cromatografia gasosa após metanólise ácida, utilizando um detector

5 FFAP e FID.

Exemplo 1:

Conversão do ácido 3-hidróxi butírico em ácido 2-hidróxi isobutírico pela cepa HCM-10

Uma suspensão de 1 g (massa seca) de células da cepa HCM-10 em 100 ml de meio basal foi introduzida em frascos de soro de 120 ml. Essa suspensão foi admisturada com 50 mg de ácido 3-hidróxi butírico, e a suspensão foi incubada em um agitador rotatório a 30°C. Depois de 0,3 hora de incubação aeróbica, a suspensão foi submetida a tratamento de gás com nitrogênio e incubada com agitação a 30°C por outras 4,4 horas. Em vários momentos, foram obtidas amostras, e o teor de ácido 2-hidróxi isobutírico e teor de ácido 3-hidróxi butírico no sobrenadante isento de células foram determinados após centrifugação da suspensão. Foi constatado ser o ácido 2-hidróxi isobutírico o único produto liberado na fase anaeróbica. Em contraste, o ácido 3-hidróxi butírico foi evidentemente degradado por completo na fase inicial aeróbica (figura 1). O rendimento de ácido 2-hidróxi isobutírico foi, neste caso, de 5,1%, com aproximadamente 80% de ácido 3-hidróxi butírico permanecendo no líquido da reação.

Exemplo 2:

Conversão do ácido 3-hidróxi butírico em ácido 2-hidróxi isobutírico por um extrato bruto da cepa HCM-10

Um extrato bruto acelular da cepa HCM-10 foi preparado ao desintegrar as células em um moinho de bolas, e os restos celulares foram subseqüentemente removidos por centrifugação. O extrato bruto acelular, em uma concentração de 10 mg de proteína em 5 ml de tampão de fosfato de potássio a 50 mM (contendo $MgCl_2$ a 1 mM em pH 7,2), foi introduzido em frascos de vidro de 10 ml com vedação. Em seguida, a esse extrato foram adicionados coenzima B12 a 0,01 mM, coenzima A a 1 mM, ATP a

- 1 mM e 4,25 mg de ácido 3-hidróxi butírico. O líquido da reação foi submetido a tratamento de gás com nitrogênio, o frasco da reação foi vedado hermeticamente e incubado com agitação a 30°C durante 2 horas. Os produtos da reação foram analisados conforme ilustrado acima. O rendimento de ácido 2-hidróxi isobutírico foi, neste caso, de 9%, com aproximadamente 88% de ácido 3-hidróxi butírico permanecendo no líquido da reação (figura 2).

Exemplo 3:

Desidratação do ácido 2-hidróxi isobutírico a metacrilato

- Uma solução de ácido 2-hidróxi isobutírico (1 mg/5 ml) produzida de acordo com o procedimento realizado no exemplo 2, foi admisturada com NaOH (0,06 mg) com agitação. A solução foi incubada com agitação e resfriamento em refluxo sob pressão reduzida (40 KPa (300 torr)) a 185-195°C. Alíquotas adicionais de 0,5 mg de ácido 2-hidróxi isobutírico por 5 ml foram adicionadas a cada hora, no decorrer de um período de 5 horas, a ditas alíquotas contendo adicionalmente 0,4 em cento por peso de p-metoxifenol para prevenir a polimerização do metacrilato. A reação foi interrompida depois de 24 horas de incubação. A conversão do ácido 2-hidróxi isobutírico em metacrilato foi de 97%. O ácido metacrílico foi removido da mistura da reação por destilação.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção enzimática de ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos de ácidos 3-hidróxi carboxílicos, caracterizado pelo fato de que um ácido 3-hidróxi carboxílico é produzido em e/ou adicionado a uma
5 solução de reação aquosa compreendendo uma unidade que tem atividade de mutase de 3-hidróxi-carboxilato-CoA, que tem ambas as atividades de produção de éster 3-hidróxi-carbonil-CoA e isomerização de éster 3-hidróxi-carbonil-CoA, e, depois da incubação, o ácido 2-hidróxi-2-metil carboxílico correspondentemente convertido é isolado como ácido ou na forma de seus
10 sais.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a unidade que tem a atividade de mutase de 3-hidróxi-carboxilato-CoA compreende uma mutase dependente de cobalamina isolada.

15 3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a unidade que tem a atividade de mutase de 3-hidróxi-carboxilato-CoA compreende uma enzima ou sistema de enzimas que produz éster de 3-hidróxi-carbonil-CoA.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a
20 3, caracterizado pelo fato de que a unidade que tem a atividade de mutase 3-hidróxi-carboxilato-CoA é um microorganismo ou um extrato bruto do mesmo.

5. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 4, caracterizado pelo fato de que os microorganismos que produzem ou compreendem uma
25 mutase dependente de cobalamina, que tem atividade de mutase de 3-hidróxi-carboxilato-CoA e tendo ambas a atividade de produção de éster 3-hidróxi-carbonil-CoA e isomerização de éster 3-hidróxi-carbonil-CoA são usados em sistemas aquosos para converter ácidos 3-hidróxi carboxílicos no ácido 2-hidróxi-2-metil carboxílico correspondente.

30 6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que

a) microorganismos com atividade de mutase de 3-hidróxi-

carboxilato-CoA, que têm ambas as atividades de produção de tioéster de 3-hidróxi-carbonil-CoA e isomerização de tioéster de 3-hidróxi-carbonil-CoA, são cultivados em um sistema aquoso com materiais brutos renováveis ou produtos de dejetos que derivam do consumo de materiais brutos renováveis como fontes de carbono e energia, pelo que os tioésteres intracelulares de 3-hidróxi-carboxilato-CoA são sintetizados e convertidos nos ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos correspondentes, e

b) o ácido 2-hidróxi-2-metil carboxílico correspondente é isolado como ácido ou na forma de seus sais.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a reação é realizada com a adição de ácido 3-hidróxi carboxílico externo.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o microrganismo é selecionado da cepa de bactérias HCM-10 DSM 18028, *Xanthobacter autotrophicus* Py2, *Rhodobacter sphaeroides* (ATCC17029) or *Nocardioides* sp. JS614.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que as células intactas dos microrganismos são usadas inalteradas, permeabilizadas ou fixadas a um suporte.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o extrato de células e/ou a mutase dependente de cobalamina e, onde apropriado, as outras enzimas tais como, por exemplo, enzimas de sintetização de éster de CoA, após isolamento parcial ou completo dos microrganismos são usadas, onde apropriado, em uma forma purificada.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que os extratos brutos de células livres de microrganismos são usados.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que as proteínas com a seqüências SEQ ID NO: 2 e/ou SEQ ID NO: 4, com as seqüências SEQ ID NO: 5 e/ou SEQ ID NO: 6, as proteínas com as seqüências SEQ ID NO: 9 e/ou SEQ ID NO: 10,

ou as proteínas com as seqüências SEQ ID NO: 13 e/ou SEQ ID NO: 14 são usadas e pelo menos 60% de seus homólogos.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que um açúcar e/ou um álcool e/ou um ácido orgânico e/ou um hidrocarboneto ou seus derivados, são usados como fontes de carbono e energia para a conversão enzimática durante a cultura.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que um substrato com um radical de terc-butila é usado como fonte de carbono e fonte de energia para a cultura.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que o álcool de terc-butila é usado como a única fonte de carbono e energia em um meio basal para a cultura.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que a conversão enzimática de um açúcar e/ou um álcool e/ou um ácido orgânico e/ou um hidrocarboneto ou seus derivados, no ácido 3-hidróxi carboxílico e do 3-hidróxicarboxílico no ácido 2-hidróxi-2-metil carboxílico é realizado em uma única etapa do método.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o ácido 2-hidróxi isobutírico é produzido com a adição de ácido 3-hidróxi butírico externo.

18. Método para a produção de ácidos isoalquenólicos C2-C3-não-saturados, caracterizado pelo fato de que um ácido 2-hidróxi-2-metil carboxílico, produzido como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, é desidratado.

19. Método para a produção de ácido metacrílico, caracterizado pelo fato de que um ácido 2-hidróxi isobutírico, produzido como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, é desidratado.

20. Cepa de microrganismos HCM-10 - DSM 18028.

21. Molécula de ácido nucléico codificando para uma enzima que tem a atividade de uma mutase dependente de cobalamina, selecionada do grupo que consiste em

a) moléculas de ácido nucléico codificando uma proteína com-

preendendo as seqüências de aminoácidos indicadas sob Seq. No. 2 e/ou Seq. No. 4;

b) moléculas de ácido nucléico compreendendo a seqüência de nucleotídeos descrita sob Seq. No. 1 e/ ou Seq. No. 3.

5 22. Molécula de ácido nucléico de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que ela codifica uma proteína que, como uma enzima oligomérica composta de duas subunidades diferentes, compreende as seqüências de aminoácidos indicadas sob as Seq. No. 2 e Seq. No. 4.

10 23. Molécula de ácido nucléico de acordo com a reivindicação 21 ou 22, que é uma molécula de DNA.

 24. Molécula de ácido nucléico de acordo com a reivindicação 23, que é um cDNA ou DNA genômico.

 25. Molécula de ácido nucléico de acordo com a reivindicação 21 ou 22, que é uma molécula de RNA.

15 26. Proteína tendo a atividade de uma mutase dependente de cobalamina codificada por uma molécula de ácido nucléico, como definida nas reivindicações 21 e 22.

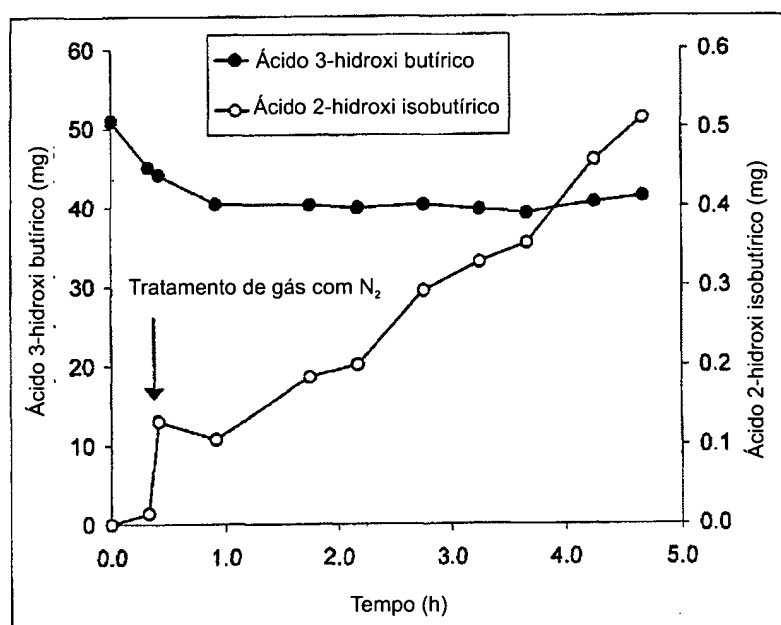
 27. Proteína com a seqüência No. 2 e pelo menos 99% de seus homólogos.

20 28. Proteína com a seqüência No. 4 e pelo menos 99% de seus homólogos.

 29. Proteína com enzima heterodimérica compreendendo a seqüência No. 2 e a seqüência No. 4.

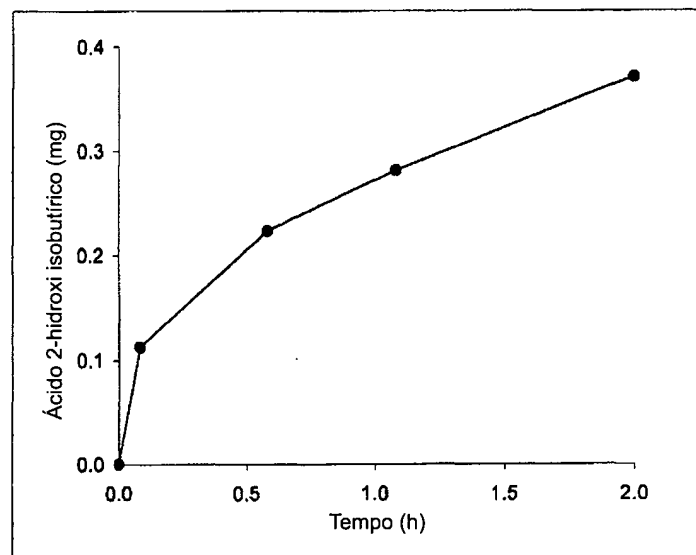
1/2

Fig. 1: Formation of 2-hydroxy isobutyric acid from 3-hydroxy butyric acid by intact cells of strain HCM-10 (Example 1) = Formação do ácido 2-hidroxi isobutírico a partir do ácido 3-hidroxi butírico por células intactas da cepa HCM-10 (Exemplo 1).



X

Fig. 2: Formation of 2-hydroxy isobutyric acid from 3-hydroxy butyric acid by a crude extract obtained from cells of strain HCM-10 (Example 2) = Formação do ácido 2-hidroxi isobutírico a partir do ácido 3-hidroxi butírico por um extrato bruto obtido de células da cepa HCM-10 (Exemplo 2).



RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODO PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS DE 2-HIDRÓXI-2-METILA".

A presente invenção refere-se a um método para a produção enzimática de ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos a partir de ácidos carboxílicos de 3-hidróxi, em que um ácido 3-hidróxi carboxílico é produzido em uma solução de reação aquosa e/ou é adicionado a essa solução de reação e é incubado. A solução de reação aquosa compreende uma unidade que tem atividade de mutase de 3-hidróxi-carboxilato-CoA que tem ambas as atividades de produção de éster de 3-hidróxi-carbonil-CoA e de isomerização de éster de 3-hidróxi-carbonila-CoA e converte o ácido 3-hidróxi carboxílico no ácido 2-hidróxi-2-metil carboxílico de que é isolado como ácido, ou na forma de seus sais. Em uma modalidade preferida, a unidade tendo atividade de mutase de 3-hidróxi-carboxilato-CoA é uma unidade que inclui uma mutase dependente de cobalamina isolada e, onde apropriado, uma enzima ou sistema de enzimas produzindo éster de 3-hidróxi-carbonil-CoA ou um microrganismo que os inclui. A invenção preferivelmente refere-se a um processo biotecnológico para produzir ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos, onde os microrganismos que têm as atividades desejadas são cultivados em um sistema aquoso com a ajuda de produtos naturais simples e convertem ésteres de 3-hidro-carbonil-CoA formados intracelularmente em ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos correspondentes. A invenção de maneira semelhante abrange a produção de ácidos 2-metil carboxílicos não saturados, onde os ácidos 2-hidróxi-2-metil carboxílicos obtidos são convertidos por desidratação nos ácidos 2-metil carboxílicos não-saturados correspondentes (ácido metacrílico e homólogos superiores).