

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043272**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.04

(21) Номер заявки
201792538

(22) Дата подачи заявки
2016.05.18

(51) Int. Cl. **C12P 7/40** (2006.01)
C12P 5/02 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)

(54) СПОСОБ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОЛУЧЕНИЯ МЕТАКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

(31) **1508582.2; 1517545.8**

(32) **2015.05.19; 2015.10.05**

(33) **GB**

(43) **2018.06.29**

(86) **PCT/GB2016/051438**

(87) **WO 2016/185211 2016.11.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МИЦУБИСИ КЕМИКАЛ ЮКей
ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:
**Истхэм Грэхам Рональд, Стефенс
Джилл, Иакуметти Эндрю (GB)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A2-2015031653**

DATABASE EPO Proteins [Online] 10 September 2014 (2014-09-10), "Sequence 1 from Patent WO2014062556", XP002759988, retrieved from EBI accession no. EPOP:JC537169, Database accession no. JC537169, sequence -& WO 2014/062556 A2 (PROCTER & GAMBLE [US]) 24 April 2014 (2014-04-24), sequence 1 is 100% identical to wildtype ACX4; the whole document

HAYASHI HIROSHI ET AL.: "A novel acyl-CoA oxidase that can oxidize short-chain acyl-CoA in plant peroxisomes", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 274, no. 18, 30 April 1999 (1999-04-30), pages 12715-12721, XP002157736, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.274.18.12715, the whole document

DATABASE UniProt [Online] 2 November 2010 (2010-11-02), "RecName: Full=4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase {ECO:0000303 PubMed:12732540}; Short=4-HBA-CoA thioesterase {ECO:0000303 PubMed:12732540}; EC=3.1.2.23", XP002759989, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q04416, Database accession no. Q04416, sequence

**WO-A1-2013044076
EP-A1-2848694**

(57) Изобретение относится к способу получения метакриловой кислоты и/или ее производных, включающему следующие этапы: (a) биологическое преобразование изобутирил-КоА в метакрилил-КоА под действием оксидазы и (b) преобразование метакрилил-КоА в метакриловую кислоту и/или ее производные. Изобретение также относится к микроорганизмам, адаптированным для проведения этапов способа.

B1**043272****043272****B1**

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к способу биологического получения метакриловой кислоты и ее производных. В частности способ относится к использованию конкретных ферментативных преобразований для получения метакриловой кислоты из изобутирил-КоА через метакрилил-КоА, и полимеров или сополимеров, получаемых из нее.

Уровень техники, предшествующий изобретению

Акриловые кислот и их сложные алкиловые эфиры, в частности, метакриловая кислота (ММА) и ее сложный метиловый эфир, метилметакрилат (ММА), являются важными мономерами в химической индустрии. Их основным применением является производство пластиков для различных применений. Наиболее значимым применением полимеризации является отливка, формование или экструзия полиметилметакрилата (РММА) с получением пластиков с высокой оптической прозрачностью. Кроме того, применение находят многие сополимеры; важными сополимерами являются сополимеры метилметакрилата и этилметакрилата с α -метилстиролом, этилакрилатом и бутилакрилатом. Кроме того, посредством простой реакции переэтерификации, ММА можно преобразовывать в другие сложные эфиры, такие как бутилметакрилат, лаурилметакрилат и т.д.

В настоящее время ММА (и ММА) получают рядом химических способов, один из которых представляет собой эффективный "альфа-способ", посредством которого ММА получают из сложного эфира, метилпропионата, посредством безводной реакции с формальдегидом. В альфа-способе метилпропионат получают посредством карбонилирования этилена. Это этиленовое сырье получают из ископаемых видов топлива. В последнее время также становится необходимым обеспечить для химической промышленности экологически безопасное сырье из биомассы. Таким образом, выгодным может стать альтернативный способ с использованием для получения ММА биомассы вместо использования альфа-способа.

Таким образом, одной из целей настоящего изобретения является решение указанной выше задачи, и предоставление биологического или частично биологического способа получения метакриловой кислоты.

Неожиданно авторы настоящего изобретения нашли способ использовать новую комбинацию субстратов ферментов, ранее не рассматриваемую для получения метакриловой кислоты на применимом в промышленности уровне, таким образом, обеспечив новый и рентабельный способ к ключевым мономерам, таким как ММА, на основе биотехнологий.

Известно, что окисление изобутирил-КоА в метакрилил-КоА в природных условиях происходит в пути I деградации валина, и в некоторых клетках выявлены ферменты, осуществляющие это преобразование. В этих системах, в преобразовании, как правило, участвует фермент ацил-КоА-дегидрогеназа, которому необходима соответствующая система транспорта электронов для сопряжения окисления субстрата с восстановлением убихинона, который затем регенерирует.

В WO201438216 описан способ получения метакриловой кислоты из микроорганизмов и на основе преобразования метакрилил-КоА в сложный эфир с использованием алкогольацилтрансфераз. В документе представлена небольшая часть преобразования 2-оксоизовалериановой кислоты в изобутирил-КоА и изобутирил-КоА в метакрилил-КоА. В нем также теоретически описано получение метакриловой кислоты из метакрилил-КоА *in vivo*, но ее успешного получения не проведено.

Однако в WO201438216 в единственном примере получения метакриловой кислоты *in vivo* используют происходящие из *Rhodococcus erythropolis* ацил-КоА-дегидрогеназы, рекомбинантно экспрессируемые в хозяине того же рода, бактерии *Rhodococcus*. В других примерах, в которых проводились попытки гетерологической экспрессии подобных ацил-КоА-дегидрогеназ, найденных в *Pseudomonas aeruginosa*, в другом организме-хозяине, не получали метакриловой кислоты. Активация или экспрессия гетерологичной ацил-КоА-дегидрогеназы в организме-хозяине является труднодостижимой и пока еще не описана.

Таким образом, дополнительной целью настоящего изобретения является предоставление улучшенного получения метакриловой кислоты.

Известного метаболического пути, в котором происходит продукция метакриловой кислоты в качестве продукта или в качестве промежуточного соединения не существует. Известно, что ферменты ацил-КоА-тиоэстеразы катализируют гидролиз структурно родственных субстратов, однако, как правило, у этих ферментов очень узкая субстратная специфичность, и ни один не был тестирован на осуществление им катализа гидролиза метакрилил-КоА. Кроме того, более редкие разновидности ацил-КоА-тиоэстераз с широкой субстратной специфичностью, вероятно, являются проблемой в биологических системах, такой как экспрессирующая клетка-хозяин, вследствие побочного гидролиза важных клеточных сложных тиоэфиров. Опять же, ни одна из них не известна, как катализирующая гидролиз метакрилил-КоА. Таким образом, до настоящего времени не показано, что эти ферменты являются эффективными для использования в промышленных применениях, включающих, включающих биологическую продукцию метакриловой кислоты.

Таким образом, дополнительной целью настоящего изобретения является решение указанной выше проблемы и предоставление эффективного ферментативного преобразования метакрилил-КоА в метакриловую кислоту, которое можно использовать в производственном процессе, и которое можно использовать независимо от любого фермента, функционирующего для преобразования изобутирил-КоА в метакрилил-КоА.

Сущность изобретения

По первому аспекту настоящего изобретения предоставлен способ получения метакриловой кислоты и/или ее производных, включающий следующие этапы:

- (а) биологическое преобразование изобутирил-КоА в метакрилил-КоА под действием оксидазы; и
- (b) преобразование метакрилил-КоА в метакриловую кислоту и/или ее производные.

По второму аспекту настоящего изобретения предоставлен способ получения метакриловой кислоты включающий следующие этапы:

- (а) преобразование изобутирил-КоА в метакрилил-КоА; и
- (b) биологическое преобразование метакрилил-КоА в метакриловую кислоту под действием тиюэстеразы, соответственно, 4-гидроксibenзоил-КоА-тиуюэстеразы (4HBT), трансферазы, синтетазы и/или фосфотрансацилазы и киназы жирных кислот с короткой цепью.

Предпочтительно, в способе по второму аспекту настоящего изобретения метакрилил-КоА преобразуют в метакриловую кислоту под действием тиюэстеразы, более предпочтительно, 4-гидроксibenзоил-КоА-тиуюэстеразы (4HBT), соответственно, из группы ЕС 3.1.2.23. Наиболее предпочтительно, метакрилил-КоА преобразуют в метакриловую кислоту под действием ацил-КоА-тиуюэстеразы 4HBT штамма SU вида *Arthrobacter*.

Преимущественно, в способах по изобретению предоставлен дополнительный биологический путь получения ключевого химического соединения метакриловой кислоты и ее известных производных, снижающий зависимость промышленности от ископаемых видов топлива и увеличивающий экологичность.

Способ обеспечивает простое преобразование возобновимого сырья в изобутирил-КоА посредством микробиологической ферментации, а коэкспрессия ферментов, катализирующих этапы (а) и (b), обеспечивает прямой путь микробиологической ферментации в МАА.

Кроме того, в способах используют ферменты для этапов (а) или (b), ранее не рассматриваемые для получения метакриловой кислоты и не найденные в природных путях метаболизма валина. В частности фермент для этапа (а) действует, преобразуя изобутирил-КоА в метакрилил-КоА без необходимости ассоциированной системы транспорта электронов, а ферменты для этапа (b) обладают высокой субстратной специфичностью к метакрилил-КоА, что позволяет избегать проблемы накопления этого промежуточного соединения в организмах хозяев. Таким образом, любой из ферментов этапов (а) или (b) можно использовать для улучшения частично химических способов получения метакриловой кислоты или для улучшения биологических процессов получения метакриловой кислоты отдельно. Альтернативно, оба фермента этапов (а) и (b) можно использовать вместе с получением независимого биологического способа получения метакриловой кислоты на промышленно применимом уровне, который кроме этого функционален в гетерологичных организмах-хозяевах.

Ферменты

В контексте настоящего изобретения "биологический" means использование биологического катализатора. Предпочтительно, биологические катализаторы представляют собой ферменты, но они могут включать любую каталитическую структуру, происходящую из биологического источника.

В контексте настоящего изобретения "химически" означает использование химических средств, отличных от использования биологического катализатора, такого как фермент.

В отношении первого аспекта, этап (b) можно проводить биологически или химически, предпочтительно биологически.

В отношении второго аспекта, этап (а) можно проводить биологически или химически, предпочтительно биологически.

Предпочтительно, этап (а) и этап (b) проводят ферментативно с использованием одного или нескольких ферментов, где ферменты действуют в качестве биологических катализаторов.

Предпочтительно оксидаза представляет собой оксидазу, действующую на связи СН-СН, с номером ЕС 1.3.x.x, более предпочтительно оксидазу, действующую на связи СН-СН с использованием в качестве акцептора электронов кислорода, с номером ЕС 1.3.3.x. Еще более предпочтительно оксидаза представляет собой ацил-КоА-оксидаза, соответственно, с номером ЕС 1.3.3.6. Более предпочтительно ацил-КоА-оксидаза выбрана из любого из следующих ферментов: ACX4 *Arabidopsis thaliana*, оксидаза ацил-КоА с короткой цепью *Arthrobacter nicotianae*, пероксисомальная ацил-КоА-оксидаза *Vigna radiata*, ацил-КоА-оксидаза вида *Candida* и ацил-КоА-оксидаза 4 *Candida tropicalis*.

Наиболее предпочтительно ацил-КоА-оксидаза представляет собой ACX4 *Arabidopsis thaliana*.

Альтернативно, изобутирил-КоА можно преобразовывать в метакрилил-КоА под действием оксидоредуктазы, соответственно, с номером группы ЕС 1.X.X.X. Предпочтительно, оксидоредуктаза представляет собой оксидоредуктазу, действующую на группу СН-СН электронодоноров, соответственно, из группы ЕС 1.3.X.X. Более предпочтительно, оксидоредуктаза, действующая на группу СН-СН доноров представляет собой FAD-зависимую оксидоредуктазу, еще более предпочтительно, оксидоредуктаза представляет собой КоА-дегидрогеназу из группы ЕС 1.3.8.X. Еще более предпочтительно, оксидоредуктаза представляет собой дегидрогеназу ацил-КоА с короткой цепью, соответственно, из группы ЕС 1.3.8.1, изовалерил-КоА-дегидрогеназу, соответственно, из группы ЕС 1.3.8.4, дегидрогеназу ацил-КоА с

2-метилразветвленной цепью, соответственно, из группы EC 1.3.8.5 или ацил-КоА-дегидрогеназу, соответственно, из группы EC 1.3.8.-, такую как изобутирил-КоА-дегидрогеназа. Наиболее предпочтительно оксидоредуктаза выбрана из любого из следующих ферментов: дегидрогеназа ацил-КоА с короткой/разветвленной цепью *Pseudomonas putida*, изобутирил-КоА-дегидрогеназа *Homo sapiens*, изовалерил-КоА-дегидрогеназа *Arabidopsis thaliana*.

Как правило, ферментам КоА-дегидрогеназам необходима ассоциированная система транспорта электронов для сопряжения окисления субстрата с восстановлением убихинона, который затем регенерирует. Такая система транспорта электронов состоит из электронопереносящего флавопротеина (ETF), и оксидоредуктазу электронопереносящего флавопротеина:убихинона (ETFQO). ETF должен быть совместим с ферментом ацил-КоА-дегидрогеназой и ETFQO. Таким образом, в вариантах осуществления, где используют ацил-КоА-дегидрогеназу, предпочтительно используют одну из указанных ниже систем регенерации.

В одном из вариантов осуществления изобутирил-КоА преобразуют в метакрилил-КоА с использованием микроорганизма-хозяина, содержащего эндогенную КоА-дегидрогеназу с активностью в отношении изобутирил-КоА и ассоциированную с ней систему транспорта электронов, такую как представляет собой система транспорта электронов в случае, например, *Pseudomonas putida*.

Во втором варианте осуществления изобутирил-КоА преобразуют в метакрилил-КоА в организме-хозяине под действием гетерологичного фермента КоА-дегидрогеназы, сопровождаемой белками системы транспорта электронов того же организма, что и гетерологичная КоА-дегидрогеназа. Например, КоА-дегидрогеназу и компоненты системы транспорта электронов *Homo sapiens*, *Pseudomonas putida*, *Paracoccus denitrificans* или *Arabidopsis thaliana* экспрессируют в *Escherichia coli* (или другом организме-хозяине).

В третьем варианте осуществления изобутирил-КоА преобразуют в метакрилил-КоА в организме-хозяине под действием гетерологичного фермента КоА-дегидрогеназы, сопровождаемой компонентами системой транспорта электронов также других микроорганизмов, при этом компоненты совместимы друг с другом и с КоА-дегидрогеназой. Например, КоА-дегидрогеназа *Homo sapiens* совместима с электронопереносящим флавопротеином *Sus scrofa*, который, в свою очередь, совместим с оксидоредуктазой электронопереносящего флавопротеина:убихинона *Rhodobacter sphaeroides*. Альтернативно, так как ETF-убихиноноксидоредуктаза *A. thaliana* обладает хорошей гомологией последовательности с ETF-убихиноноксидоредуктазой *R. sphaeroides*, изовалерил-КоА-дегидрогеназа и ETF *A. thaliana* могут формировать функциональную систему с ETF-убихиноноксидоредуктазой *R. sphaeroides* для окисления изобутирил-КоА. Наконец, теоретически рассчитано, что ETF и ETF-убихиноноксидоредуктаза *Paracoccus denitrificans* совместимы с изобутирил-КоА-дегидрогеназой из другого источника, такого как изобутирил-КоА-дегидрогеназа *H. sapiens* или ее гомологи из других организмов, вследствие сходства ETF *P. denitrificans* с ETF человек и свиньи.

Предпочтительно, метакрилил-КоА преобразуют в метакриловую кислоту под действием гидролазы сложных тиоэфиров (также известной как тиоэстераза), соответственно, из группы EC 3.1.2.X. Еще более предпочтительно фермент представляет собой ацил-КоА-тиоэстеразу, соответственно, из группы EC 3.1.2.20, 3-гидроксизобутирил-КоА-гидролазу, соответственно, из группы EC 3.1.2.4, АДФ-зависимую ацил-КоА-тиоэстеразу, соответственно, из группы EC 3.1.2.18, 4-гидроксibenzoил-КоА-тиоэстеразу, соответственно, из группы EC 3.1.2.23 или тиоэстеразу из группы EC 3.1.2.-, такую как, например, салицилоил-КоА-тиоэстераза. Более предпочтительно тиоэстераза выбрана из любого из следующих ферментов: 4НВТ штамма SU вида *Arthrobacter*, 4НВТ *Arthrobacter globiformis*, 4НВТ штамма CBS-3 вида *Pseudomonas*, EntH *Escherichia coli*, YciA *E. coli*, YciA *Haemophilus influenzae*, TesA *Escherichia coli* или TesB *Escherichia coli*, FcoT *Mycobacterium tuberculosis*. Еще более предпочтительно, тиоэстераза представляет собой ацил-КоА-тиоэстеразу. Еще более предпочтительно, тиоэстераза представляет собой 4-гидроксibenzoил-КоА-тиоэстеразу, соответственно, из группы EC 3.1.2.23. Наиболее предпочтительно ацил-КоА-тиоэстераза представляет собой 4НВТ штамма SU вида *Arthrobacter*.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобутирил-КоА можно преобразовывать в метакрилил-КоА под действием оксидазы, а метакрилил-КоА можно преобразовывать в метакриловую кислоту под действием 4-гидроксibenzoил-КоА-тиоэстеразы, соответственно, из группы EC 3.1.2.23, более предпочтительно ацил-КоА-тиоэстеразы 4НВТ штамма SU вида *Arthrobacter*.

В одном из вариантов осуществления изобутирил-КоА можно преобразовывать в метакрилил-КоА под действием ацил-КоА-оксидазы, соответственно, с номером группы EC 1.3.3.6, более предпочтительно ACSX4 *Arabidopsis thaliana*, а метакрилил-КоА можно преобразовывать в метакриловую кислоту под действием 4-гидроксibenzoил-КоА-тиоэстеразы, соответственно, из группы EC 3.1.2.23, более предпочтительно ацил-КоА-тиоэстеразы 4НВТ штамма SU вида *Arthrobacter*.

Альтернативно, метакрилил-КоА можно преобразовывать в метакриловую кислоту по одному из указанных ниже ферментативных путей.

В одном из вариантов осуществления метакрилил-КоА преобразуют в метакриловую кислоту под действием трансферазы, соответственно, с номером группы EC 2.X.X.X. Предпочтительно трансфераза представляет собой трансферазу, которая переносит содержащие серу группы, соответственно, с номе-

ром группы ЕС 2.8.X.X. Более предпочтительно, трансфераза представляет собой КоА-трансферазу, соответственно, с номером группы ЕС 2.8.3.X. Еще более предпочтительно, трансфераза представляет собой ацетат-зависимую ацил-КоА-трансферазу или ацетоацетат-зависимую бутирил-КоА-трансферазу, соответственно, с номером группы ЕС 2.8.3.8 и 2.8.3.9 соответственно. Наиболее предпочтительно трансфераза выбрана из любого из следующих ферментов: бутирил-КоА:ацетоацетат-КоА-трансфераза вида *Clostridium* SB4, бутирил-КоА:ацетоацетат-КоА-трансфераза *Clostridium sticklandii*, бутират:ацетоацетат-КоА-трансфераза ATCC824 *Clostridium acetobutylicum*, ацетат-кофермент-А-трансфераза ydiF *Escherichia coli*.

Как используют в настоящем документе, термины лигаза, синтетаза и синтаза используют взаимозаменяемо, как понимают в данной области.

Во втором варианте осуществления метакрилил-КоА преобразуют в метакриловую кислоту под действием синтетазы, действующе в обратном направлении, соответственно, с номером группы ЕС 6.X.X.X. Предпочтительно синтетаза представляет собой формирующую связи углерод-сера синтетазу, соответственно, с номером группы ЕС 6.2.X.X. Более предпочтительно синтетаза представляет собой кислота-тиол-лигазу, соответственно, с номером группы ЕС 6.2.1.X. Наиболее предпочтительно, синтетаза представляет собой обратимую АДФ- или ГДФ-формирующую ацил-КоА-лигазу, такую как ГДФ-формирующая сукцинат-КоА-синтетаза, соответственно, из группы ЕС 6.2.1.4, АДФ-формирующая сукцинат-КоА-синтетаза, из группы ЕС 6.2.1.5, АДФ-формирующая глутарат-КоА-синтетаза с номером ЕС 6.2.1.6, АДФ-формирующая малат-КоА-синтетаза с номером ЕС 6.2.1.9, ГДФ-формирующая (карбоновая кислота)-КоА-синтетаза с номером ЕС 6.2.1.10, АДФ-формирующая ацетат-КоА-синтетаза с номером ЕС 6.2.1.13 или АДФ-формирующая цитрат-КоА-синтетаза с номером ЕС 6.2.1.18.

В третьем варианте осуществления метакрилил-КоА преобразуют в метакриловую кислоту посредством комбинированного действия фосфотрансацилазы, сходной с фосфотрансацетилазой или фосфотрансбутирилазой с номером группы ЕС 2.X.X.X, более предпочтительно с номером группы ЕС 2.3.X.X, еще более предпочтительно ЕС 2.3.1.X, наиболее предпочтительно с номерами групп ЕС 2.3.1.8 или 2.3.1.19, и киназы жирных кислот с короткой цепью с номером группы ЕС 2.X.X.X, предпочтительно ЕС 2.7.X.X, более предпочтительно ЕС 2.7.2.X, наиболее предпочтительно ацетаткиназы с номером ЕС 2.7.2.1, формиаткиназы с номером ЕС 2.7.2.6, бутираткиназы с номером ЕС 2.7.2.7, киназы жирных кислот с разветвленной цепью с номером ЕС 2.7.2.14 или пропионаткиназы с номером ЕС 2.7.2.15. Предпочтительно фосфотрансацилаза представляет собой метакрилил-КоА-фосфотрансацилазу. Предпочтительно киназа жирных кислот с короткой цепью представляет собой обратимую киназу метакриловой кислоты. Наиболее предпочтительно фосфотрансацилаза выбрана из любого из следующих ферментов: фосфотрансбутирилаза ATCC824 *Clostridium acetobutylicum*. Наиболее предпочтительно киназа жирных кислот с короткой цепью выбрана из любого из следующих ферментов: киназа жирных кислот с разветвленной цепью *Spirochete* MA-2, бутираткиназа *Thermotoga maritima*, бутираткиназа *Clostridium butyricum*.

В контексте настоящего изобретения термин "ее (их) производные" означает любое химическое соединение, прямо родственное или содержащее метакрилил-КоА или метакриловую кислоту, например, их сложные эфиры, их ацилгалогениды, их ангидриды, их амиды, их нитрилы, их лактоны, их соли, их комплексы, их изомеры, олигомеры или полимеры и, кроме того, любые их замещенные версии, более предпочтительно, это означает их сложные эфиры или соли.

Предпочтительно производные метакриловой кислоты представляют собой сложные эфиры метакриловой кислоты. Предпочтительно сложные эфиры метакриловой кислоты представляют собой алкил-метакрилаты, более предпочтительно метакрилаты низших алкилов (C_1 - C_{20}), еще более предпочтительно, C_1 - C_{12} -алкилметакрилаты, особенно предпочтительно сложные C_1 - C_4 -алкиловые эфиры, такие как метил-, этил- или бутилметакрилаты или сложные C_4 - C_{12} -алкиловые эфиры. Наиболее предпочтительно, сложные эфиры метакриловой кислоты представляют собой бутилметакрилаты, например, *n*-бутилметакрилат.

Сложные эфиры метакриловой кислоты можно получать биологически из метакрилил-КоА, предпочтительно под действием фермента трансферазы с номером группы ЕС 2.X.X.X, более предпочтительно ацилтрансферазы с номером группы ЕС 2.3.X.X, еще более предпочтительно алкогольацилтрансферазы с номером группы ЕС 2.3.1.84.

Предпочтительно, когда сложные эфиры метакриловой кислоты получают биологически из метакрилил-КоА, метакрилил-КоА получают биологически из изобутирил-КоА под действием оксидазы.

Таким образом, по третьему аспекту настоящего изобретения предоставлен способ получения сложного эфира метакриловой кислоты, включающий следующие этапы:

- (а) биологическое преобразование изобутирил-КоА в метакрилил-КоА под действием оксидазы; и
- (б) преобразование метакрилил-КоА в сложный эфир метакриловой кислоты под действием алкогольацилтрансферазы.

Предпочтительно оксидаза по третьему аспекту представляет собой оксидазу, действующую на связи $CH-CH$, с номером ЕС 1.3.x.x, более предпочтительно оксидазу, действующую на связи $CH-CH$ с использованием в качестве акцептора электронов кислорода, с номером ЕС 1.3.3.x. Еще более предпочтительно, оксидаза представляет собой ацил-КоА-оксидазу, соответственно, с номером ЕС 1.3.3.6. Более

предпочтительно ацил-КоА-оксидаза выбрана из любого из следующих ферментов: ACX4 *Arabidopsis thaliana*, оксидаза ацил-КоА с короткой цепью *Arthrobacter nicotianae*, пероксисомальная ацил-КоА-оксидаза *Vigna radiata*, ацил-КоА-оксидаза вида *Candida* и ацил-КоА-оксидаза 4 *Candida tropicalis*. Наиболее предпочтительно ацил-КоА-оксидаза представляет собой ACX4 *Arabidopsis thaliana*.

Предпочтительно, сложные эфиры метакриловой кислоты по третьему аспекту представляют собой алкилметакрилаты, более предпочтительно, метакрилаты низших алкилов (C_1 - C_{20}), еще более предпочтительно, C_1 - C_{12} -алкилметакрилаты, особенно сложные C_1 - C_4 -алкиловые эфиры, такие как метил-, этил- или бутилметакрилаты, или сложные C_4 - C_{12} -алкиловые эфиры. Наиболее предпочтительно, сложные эфиры метакриловой кислоты представляют собой бутилметакрилаты, например, н-бутилметакрилат.

Соответственно, алкогольацилтрансфераза действует в присутствии спирта или фенол, предпочтительно неразветвленного или разветвленного незамещенного C_{1-20} -спирта, аралкилового спирта или фенола, и особенно предпочтительно C_{1-8} - или C_{1-4} -алкилового спирта, такого как метанол, этанол, н-пропанол, изопропанол, н-бутанол, изобутанол, втор-бутанол, трет-бутанол, н-пентиловый спирт, изопентиловый спирт, трет-пентиловый спирт, н-гексильный спирт, изогексильный спирт, 2-гексильный спирт, диметилбутиловый спирт, этилбутиловый спирт, гептиловый спирт, октиловый спирт, 2-этилгексильный спирт, бензиловый спирт или фенол.

Предпочтительно, алкогольацилтрансфераза действует в присутствии спирта, более предпочтительно C_1 - C_{12} -спирта, более предпочтительно C_1 - C_4 - или C_4 - C_{12} -спирта, еще более предпочтительно в присутствии бутанола, такого как н-бутанол, изобутанол, втор-бутанол или трет-бутанол. Наиболее предпочтительно, алкогольацилтрансфераза действует в присутствии н-бутанола.

Под термином спирт в настоящем документе подразумевают молекулы с гидроксильной группой (группой -ОН), которые способны к формированию сложноэфирной группы с метакрилатом. Предпочтительно, спирт может представлять собой C_1 - C_{20} -алканол, более предпочтительно C_1 - C_{12} -алканол, еще более предпочтительно C_1 - C_4 -алканол или C_4 - C_{12} -алканол, наиболее предпочтительно C_4 -алканол.

Предпочтительно алкогольацилтрансфераза является растительного происхождения, более предпочтительно растение принадлежит к любому порядку, выбранному из группы, состоящей из Zingiberales, Rosales, Ericales, Cucurbitales, Brassicales и Laurales; еще более предпочтительно растение принадлежит любому семейству, выбранному из группы, состоящей из Musaceae, Rosaceae, Ericaceae, Actinidiaceae, Cucurbitaceae, Caricaceae и Lauraceae; еще более предпочтительно растение принадлежит любому роду, выбранному из группы, состоящей из Musa, Fragaria, Malus, Prunus, Pyrus, Vaccinium, Actinidia, Cucumis, Carica и Persea; еще более предпочтительно растение представляет собой любое растение, выбранное из группы, состоящей из банана, клубники, яблока, Prunus mume, Pyrus communis, черники, киви, дыни, папайя и авокадо. Наиболее предпочтительно, алкогольацилтрансфераза получают из фруктового источника, например, яблока, дыни или томата, наиболее соответственно, яблока.

Можно использовать биологическую ткань или ее переработанный продукт, например, плод, листья, лепестки, стебель, семена, кожу плода, мясистую часть плода и т.д., где присутствует алкогольацилтрансфераза. Альтернативно можно использовать содержащую неочищенный фермент жидкость, экстрагированную из этих биологических тканей, очищенный фермент или т.п. Альтернативно, можно выделять ген алкогольацилтрансферазы и вносить в микроорганизм-хозяина с экспрессией в нем.

Использование алкогольацилтрансферазы для преобразования метакрилил-КоА в сложные эфиры метакриловой кислоты полностью описано в WO2014/038214, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки, в частности, гены алкогольацилтрансфераз и их последовательности и векторные плазмиды, содержащие указанные последовательности.

Дополнительные этапы способа.

Необязательно способ по первому или второму аспектам настоящего изобретения может дополнительно включать этап (с) преобразования любой метакриловой кислоты, полученной на этапе (b), в сложный эфир метакриловой кислоты.

Предпочтительно сложные эфиры метакриловой кислоты представляют собой алкилметакрилаты, более предпочтительно метакрилаты низших алкилов (C_1 - C_{20}), более предпочтительно C_1 - C_{12} -алкилметакрилаты, еще более предпочтительно C_1 - C_4 - или C_4 - C_{12} -алкилметакрилаты. Наиболее предпочтительно, сложные эфиры метакриловой кислоты представляют собой бутилметакрилат.

Сложные эфиры метакриловой кислоты, получаемые на этапе (с) можно получать биологически или химически, предпочтительно их получают биологически.

Необязательно, этап (с) можно проводить химически посредством реакции этерификации с подходящим спиртом. Условия реакции, в которых проводят этерификацию, могут значительно варьировать. Реакция проходит очень медленно при комнатной температуре, но достаточно быстро при повышенных температурах. Как правило, для направления реакция один из реагентов используют в стехиометрическом избытке. Тогда другой реагент называют лимитирующим реагентом. Приблизительно 99% лимитирующего реагента, например, кислот, спиртов или полиолов, можно преобразовывать в сложный эфир в течение нескольких часов. Как правило, лимитирующие реагенты представляют собой реагенты, которые не присутствуют в стехиометрическом избытке, например, лимитирующими реагентами, используемыми для получения сложных полиоловых эфиров, являются полиолы.

Так как этерификация спирта и органической кислоты является обратимой реакцией, реакция этерификации в норме не проходит до завершения. Однако, удаляя по меньшей мере один из продуктов этерификации, как правило воду, можно достигать преобразования более 99%. Если один из продуктов кипит при более низкой температуре, чем другой, и чем реагенты, его удаление, как правило, проводят перегонкой. В данной области известен ряд способов перегонки с удалением получаемой воды из зоны реакции. Один из способов удаления воды включает проведение реакции в жидкой среде, которая может формировать азеотропную смесь с температурой кипения, которая является меньшей, чем температура кипения любого или каждого из компонентов реакции. Если температуры кипения реагентов и получаемого сложного эфира составляют более 100°C при атмосферном давлении, тогда для удаления воды можно просто отрегулировать температуру реакции и жидкой среды, способной формировать азеотропную смесь с водой не требуется. Кроме того, для содействия перегонке воды из реакционной смеси можно использовать выводящее вещество. В качестве выводящего вещества при получении сложных эфиров можно использовать инертные вещества, такие как циклогексан, гексан, бензол, толуол или ксилол. Кроме того, в качестве выводящего вещества также можно использовать реагент с более низкой температурой кипения. В этом последнем случае, реагент, используемый в качестве выводящего вещества, как правило добавляют в реакционную смесь в избытке по сравнению со стехиометрическими количествами, требуемыми для реакции. Способы этерификации, включая способы с использованием удаления воды, можно проводить в периодическом режиме или непрерывном режиме. Различные способы этерификации описаны в томе 9 the Kirk-Othmer Encyclopaedia of Chemical Technology, Fourth Edition (1994), pp. 762-768, таким образом, полностью включенной в качестве ссылки.

Общепринятый периодический способ этерификации включает помещение всех реагентов в реактор в начале реакционного цикла. В способах каталитической этерификации катализатор, как правило, добавляют в реакционную смесь после достижения партии заданной температуры. Затем реакционную смесь можно нагревать дальше. Температуру реакционной смеси поднимают до достижения температуры кипения реакционной смеси, при которой выводящее вещество, если используют, и водный побочный продукт выкипают из реакционной смеси. Как правило, отводимые сверху пары конденсируют, от выводящего вещества отделяют воду, и выводящее вещество возвращают в сосуд реактора. Температура реакции, и таким образом скорость реакции, лимитирована температурой кипения реакционной смеси. Когда реагент с меньшей температурой кипения также используют в качестве выводящего вещества, его концентрация по мере прохождения реакции постепенно снижается. Также по ходу реакции снижаются концентрации реагентов, что отрицательно сказывается на скорости реакции. Таким образом, по мере прохождения реакции температура реакции, и, таким образом, константа скорости реакции возрастают вне зависимости от того, используют ли выводящее вещество или нет, особенно, если нагрев в течение реакции продолжают.

Предпочтительно этап (с) проводят биологически под действием фермента эстеразы или гидролазы, действующего в отношении сложноэфирной связи, с номером группы EC 3.1.X.X., более предпочтительно, ферментов с номером EC 3.1.1.X, и они представляют собой класс ферментов гидролаз, участвующих в катализе расщепления и формирования сложноэфирных связей. Последним обзором эстераз микроорганизмов является: Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci (2013) 2(7): 135-146.

Предпочтительно способ дополнительно включает один или несколько дополнительных этапов получения изобутирил-КоА, более предпочтительно получения изобутирил-КоА из 2-кетоиовалериановой кислоты и/или из изомасляной кислоты.

В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает один или несколько дополнительных этапов получения изобутирил-КоА из 2-кетоиовалериановой кислоты, где один или несколько дополнительных этапов являются любыми из указанных ниже.

Предпочтительно способ дополнительно включает этап преобразования 2-кетоиовалериановой кислоты в изобутирил-КоА. Более предпочтительно 2-кетоиовалериановую кислоту преобразуют в изобутирил-КоА посредством ферментного комплекса дегидрогеназы кетокислот с разветвленной цепью, состоящего из компонента альфа-субъединицы, компонента липоамидацилтрансферазы и компонента липоамиддегидрогеназы. Наиболее предпочтительно, дегидрогеназа выбрана из любого из следующих ферментов: дегидрогеназа кетокислот с разветвленной цепью (BCKD) *P. putida*, BCKD *Bacillus subtilis*, BCKD *P. aeuruginosa*, BCKD *A. thaliana*, BCKD *Streptomyces coelicolor* и BCKD *Thermus thermophilus*.

Альтернативно, преобразование 2-кетоиовалериановой кислоты в изобутирил-КоА может катализировать фермент оксидоредуктаза, соответственно, из группы EC 1.X.X.X, предпочтительно оксидоредуктаза, действующая на альдегидную или оксогруппу доноров, соответственно, из группы EC 1.2.X.X, более предпочтительно фермент оксидоредуктаза, действующая на альдегидную или оксогруппу доноров с использованием содержащего железо и серу белка в качестве акцептора электронов, соответственно, из группы EC 1.2.7.X, наиболее предпочтительно 2-кетоиовалератферредоксинредуктаза (также известная как кетовалинферредоксиноксидоредуктазы), соответственно, с номером группы EC 1.2.7.7, которая представляет собой тетрамер, состоящий из альфа, бета, гамма и дельта субъединиц. Примерами таких ферментов являются 2-кетоиовалератферредоксинредуктаза *Rugosoccus furiosus*; 2-кетоиовалератферредоксинредуктаза вида *Rugosoccus*; 2-кетоиовалератферредоксинредуктаза вида

Thermococcus; 2-кетоизовалератферредоксинредуктаза *Thermococcus litoralis*; 2-кетоизовалератферредоксинредуктаза *Thermococcus profundus* и 2-кетоизовалератферредоксинредуктаза *Methanobacterium thermoautotrophicum*.

Во втором варианте осуществления способ дополнительно включает один или несколько дополнительных этапов получения изобутирил-КоА из изомасляной кислоты, где один или несколько дополнительных этапов представляют собой любой из представленных ниже.

Предпочтительно способ дополнительно включает этап преобразования изомасляной кислоты в изобутирил-КоА.

Необязательно, изомасляную кислоту преобразуют в изобутирил-КоА под действием фермента лигазы, соответственно, с номером группы ЕС 6.X.X.X, предпочтительно формирующей связи углерод-сера лигазы из группы ЕС 6.2.X.X, более предпочтительно формирующей тиолы кислот лигазы из группы ЕС 6.2.1.X, более предпочтительно ГДФ-формирующей, АДФ-формирующей или АМФ-формирующей лигазы, такой как АМФ-формирующая ацетат-КоА-лигаза, соответственно, из группы ЕС 6.2.1.1, бутират-КоА-лигаза, соответственно, из группы ЕС 6.2.1.2, (карбоновая кислота)-КоА-лигаза, соответственно, из группы ЕС 6.2.1.10, АДФ-формирующая ацетат-КоА-лигаза, соответственно, из группы ЕС 6.2.1.13, пропионат-КоА-лигаза, соответственно, из группы ЕС 6.2.1.17 или лигаза тиолов кислот из группы ЕС 6.2.1.-. Наиболее предпочтительно лигаза выбрана из любого из следующих ферментов: AcsA *Pseudomonas chlororaphis*, бутирил-КоА-синтетаза *Raecilomyces varioti*, бутирил-КоА-синтетаза митохондрий сердца быка.

В третьем варианте осуществления, способ дополнительно включает один или несколько дополнительных этапов получения изобутирил-КоА из изобутирата, где один или несколько дополнительных этапов представляют собой любой из представленных ниже.

Предпочтительно способ дополнительно включает этап преобразования изобутирата в изобутирилфосфат и этап преобразования изобутирилфосфата в изобутирил-КоА.

Предпочтительно изобутират преобразуют в изобутирилфосфат посредством фермента киназы, соответственно, с номером группы ЕС 2.X.X.X, предпочтительно с номером ЕС 2.7.X.X, более предпочтительно с номером группы ЕС 2.7.2.X, наиболее предпочтительно ацетаткиназы, соответственно, из группы ЕС 2.7.2.1, формиаткиназы с номером ЕС 2.7.2.6, бутираткиназы с номером ЕС 2.7.2.7, киназы жирных кислот с разветвленной цепью с номером ЕС 2.7.2.14 или пропионаткиназы с номером ЕС 2.7.2.15. Наиболее предпочтительно киназа выбрана из любого из следующих ферментов: киназа жирных кислот с разветвленной цепью *Spirochete MA-2*, бутираткиназа *C. butylicum*.

Предпочтительно изобутирилфосфат преобразуют в изобутирил-КоА под действием фермента трансферазы с номером группы ЕС 2.X.X.X, более предпочтительно под действием ацилтрансферазы с номером группы ЕС 2.3.X.X, еще более предпочтительно под действием ацилтрансферазы, переносящей группы отличные от аминокислотных групп, с номером группы ЕС 2.3.1.X. Еще более предпочтительно фосфатацетилтрансферазы или фосфатбутирилтрансферазы с номером групп ЕС 2.3.1.8 и 2.3.1.19, соответственно. Более предпочтительно трансфераза представляет собой фосфатбутирилтрансферазу ATCC824 *Clostridium acetobutylicum* или фосфатацетилтрансферазу *Bacillus subtilis*, ATCC13032 *Corynebacterium glutamicum*, *Thermotoga maritima* и *Clostridium kluyveri*. Другие источники этих ферментов включают другие анаэробные бактерии, особенно виды *Clostridium*, такие как *Clostridium pasteurianum* или *Clostridium beijerinckii*.

Наиболее предпочтительно способ дополнительно включает этап получения изобутирил-КоА из изомасляной кислоты под действием фермента синтетазы, предпочтительно изобутирил-КоА-синтетазы, наиболее предпочтительно изобутирил-КоА-синтетазы (AcsA) *P. chlororaphis* B23.

Необязательно, любой из дополнительных этапов способа, как описано выше в настоящем документе в отношении первого, и/или второго, и/или третьего вариантов осуществления, можно комбинировать.

Микроорганизмы.

Ферменты из указанного выше способа могут присутствовать у одного или нескольких микроорганизмов, или находиться без микроорганизмов, например, в виде бесклеточного экстракта или очищенного фермента в реакционном сосуде или удерживаемого на колонке.

Предпочтительно биологические преобразования способа проводят в одном или нескольких микроорганизмах-хозяевах. Более предпочтительно один или несколько ферментов для проведения биологических преобразований присутствуют у одного или нескольких микроорганизмов.

Предпочтительно один или несколько микроорганизмов экспрессируют один или несколько ферментов, необходимых для катализа соответствующего этапа(ов). Более предпочтительно, соответствующий этап(ы) и любые другие ферментативные этапы проводят *in vivo*, в одном или нескольких микроорганизмах.

По четвертому аспекту настоящего изобретения предоставлен микроорганизм для применения в получении метакриловой кислоты и/или ее производных способом по любому из первого, второго или третьего аспектов.

Один или несколько микроорганизмов могут экспрессировать один или несколько ферментов в природных условиях, или их можно генетически конструировать для экспрессии одного или нескольких

ферментов, или они могут экспрессировать комбинацию ферментов дикого типа или генетически сконструированных ферментов. Такой генетически сконструированный организм можно описать как рекомбинантный организм.

Один или несколько микроорганизмов могут экспрессировать один или несколько ферментов эндогенно или гетерологично, или могут экспрессировать комбинацию эндогенных и гетерологичных ферментов.

В контексте настоящего изобретения, термин "рекомбинантный организм" означает генетически модифицированный или сконструированный организм, содержащий генетический материал, который искусственно сконструирован и встроен в организм. Генетический материал может содержать эндогенные или гетерологичные нуклеиновые кислоты, которые можно дополнительно генетически модифицировать или не модифицировать.

В контексте настоящего изобретения термин "эндогенный" означает полученный из организма того же вида.

В контексте настоящего изобретения термин "гетерологичный" означает полученный из организма другого вида.

В контексте настоящего изобретения термин "адаптированный", когда его используют в отношении микроорганизма, означает генетически модифицированный или сконструированный организм, как определено выше, или мутантный штамм организма, который, например, выбран на основе того, что он в природных условиях экспрессирует один или несколько ферментов.

Микроорганизм(ы) для применения в любом из указанных выше способов, генетически сконструированные или модифицированные, как описано выше, можно выбирать из встречающегося в природе дикого типа или неприродных рекомбинантных микроорганизмов, например, бактерий, архей, дрожжей, грибов, водорослей или любого из ряда других микроорганизмов, доступных для способов ферментации.

Таким образом, по пятому аспекту настоящего изобретения предоставлен рекомбинантный микроорганизм для применения в способе получения метакриловой кислоты, где микроорганизм адаптирован для проведения следующих этапов:

(а) биологическое преобразование изобутирил-КоА в метакрилил-КоА посредством экспрессии оксидазы; и

(b) биологическое преобразование метакрилил-КоА в метакриловую кислоту; где рекомбинантный микроорганизм представляет собой *Escherichia coli*.

По шестому аспекту настоящего изобретения предоставлен микроорганизм, для применения в способ получения метакриловой кислоты, где микроорганизм модифицирован одной или несколькими гетерологичными нуклеиновыми кислотами для проведения следующих этапов:

(а) биологическое преобразование изобутирил-КоА в метакрилил-КоА посредством экспрессии оксидазы; и

(b) биологическое преобразование метакрилил-КоА в метакриловую кислоту.

По седьмому аспекту настоящего изобретения предоставлен микроорганизм, адаптированный для проведения следующих этапов:

(а) биологическое преобразование изобутирил-КоА в метакрилил-КоА посредством экспрессии оксидазы; и

(b) биологическое преобразование метакрилил-КоА в метакриловую кислоту и/или ее производные.

По восьмому аспекту настоящего изобретения предоставлен микроорганизм, адаптированный для проведения следующих этапов:

(а) биологическое преобразование изобутирил-КоА в метакрилил-КоА; и

(b) биологическое преобразование метакрилил-КоА в метакриловую кислоту посредством экспрессии тиюэстеразы, соответственно, 4-гидроксibenzoил-КоА-тиуюэстеразы (4HBT), трансферазы, синтетазы и/или фосфотрансацилазы и киназы жирных кислот с короткой цепью.

По дополнительному аспекту настоящего изобретения предоставлен микроорганизм, адаптированный для преобразования метакрилил-КоА в метакриловую кислоту посредством экспрессии тиюэстеразы, соответственно, 4-гидроксibenzoил-КоА-тиуюэстеразы (4HBT), трансферазы, синтетазы и/или фосфотрансацилазы и киназы жирных кислот с короткой цепью.

По еще одному дополнительному аспекту настоящего изобретения предоставлен микроорганизм, модифицированный одной или несколькими рекомбинантными нуклеиновыми кислотами, кодирующими один или несколько ферментов, которые преобразуют метакрилил-КоА в метакриловую кислоту.

По еще одному дополнительному аспекту настоящего изобретения предоставлен микроорганизм, модифицированный одной или несколькими рекомбинантными нуклеиновыми кислотами, кодирующими один или несколько ферментов, которые преобразуют метакрилил-КоА в сложные эфиры метакриловой кислоты.

По еще одному дополнительному аспекту настоящего изобретения предоставлен способ получения метакриловой кислоты с использованием одного или нескольких ферментов по дополнительным аспектам.

По еще одному дополнительному аспекту настоящего изобретения предоставлен способ получения

сложных эфиров метакриловой кислоты с использованием одного или нескольких ферментов по дополнительным аспектам.

Дополнительные предпочтительные характеристики способа по первому, второму или третьему аспектам можно комбинировать в любой комбинации с микроорганизмом по четвертому, пятому, шестому, седьмому, восьмому или дополнительным аспектам, определенным выше в настоящем документе.

В одном из вариантов осуществления микроорганизм(ы) экспрессирует по меньшей мере следующие ферменты:

- (a) (i) ацил-КоА-оксидазу; и/или
- (ii) КоА-дегидрогеназу; и необязательно один или несколько из:
- (b) (i) ацил-КоА-тиоэстеразы, соответственно, 4-гидроксibenzoил-КоА-тиоэстеразы (4НВТ); и/или
- (ii) ацил-КоА-трансферазы; и/или
- (iii) ацил-КоА-синтетазы; и/или
- (iv) фосфотрансацилазы и киназы жирных кислот с короткой цепью; и необязательно
- (v) алкогольацилтрансферазы.

В одном из вариантов осуществления микроорганизм(ы) экспрессирует по меньшей мере следующие ферменты:

- (a) (i) ацил-КоА-оксидаза; и необязательно один или несколько из:
- (b) (i) ацил-КоА-тиоэстеразы; и/или (ii) ацил-КоА-трансферазы; и/или
- (iii) ацил-КоА-синтетазы; и/или
- (iv) фосфотрансацилазы и киназы жирных кислот с короткой цепью; и необязательно
- (v) алкогольацилтрансферазы.

В одном из вариантов осуществления по четвертому, пятому или восьмому аспектам, микроорганизм(ы) экспрессирует по меньшей мере следующие ферменты:

- (a) (i) ацил-КоА-тиоэстеразу, соответственно, 4-гидроксibenzoил-КоА-тиоэстеразу (4НВТ); и/или
- (ii) ацил-КоА-трансферазу; и/или (iii) ацил-КоА-синтетазу; и/или
- (iv) фосфотрансацилазу и киназу жирных кислот с короткой цепью; и необязательно один или несколько из:

- (b) (i) ацил-КоА-оксидазу; и/или
- (ii) ацил-КоА-дегидрогеназу; и дополнительно необязательно
- (c) (i) алкогольацилтрансферазу.

Предпочтительно, когда она присутствует, КоА-дегидрогеназу дополняют комплементарной системой транспорта электронов.

В предпочтительном варианте осуществления микроорганизм(ы) экспрессируют по меньшей мере один из следующих ферментов:

- (a) ацил-КоА-оксидазу, такую как ACX4; и
- (b) ацил-КоА-тиоэстеразу, такую как 4НВТ.

В более предпочтительном варианте осуществления микроорганизм(ы) экспрессируют по меньшей мере один из следующих ферментов:

- (a) ACX4, соответственно, *A. thaliana*; и
- (b) 4НВТ, соответственно, вида *Arthrobacter*

В определенных вариантах осуществления микроорганизм адаптирован для проведения следующих этапов:

(a) биологическое преобразование изобутирил-КоА в метакрилил-КоА посредством экспрессии ацил-КоА-оксидазы; и

(b) биологическое преобразование метакрилил-КоА в сложный C₁-C₂₀-эфир метакриловой кислоты, соответственно, сложный C₁-C₁₂-эфир метакриловой кислоты, такой как сложный C₁-C₄- или C₄-C₁₂-эфир метакриловой кислоты, посредством экспрессии алкогольацилтрансферазы.

Предпочтительно, сложный эфир метакриловой кислоты представляет собой сложный C₁-C₂₀-эфир метакриловой кислоты, более предпочтительно сложный C₁-C₁₂-эфир метакриловой кислоты, еще более предпочтительно сложный C₁-C₄- или C₄-C₁₂-эфир метакриловой кислоты, наиболее предпочтительно бутилметакрилат.

В этих вариантах осуществления микроорганизм может представлять собой *Escherichia coli* и/или ацил-КоА-оксидаза представляет собой ACX4 *Arabidopsis thaliana*, и/или алкогольацилтрансферазу получают из растительного источника, как указано в настоящем документе, например, плода, такого как яблоко, и/или микроорганизм представляет собой рекомбинантный микроорганизм. Предпочтительно микроорганизм может представлять собой *Escherichia coli*, ацил-КоА-оксидаза может представлять собой ACX4 *Arabidopsis thaliana*, алкогольацилтрансферазу можно получать из яблока, дыни или томата, и микроорганизм может представлять собой рекомбинантный организм.

Предпочтительно микроорганизм(ы) экспрессирует все указанные ферменты (a) и (b) по указанным предпочтительным или определенным вариантам осуществления.

Предпочтительно микроорганизм(ы) дополнительно экспрессирует один или несколько из следующих ферментов: фермент дегидрогеназа кетокислот с разветвленной цепью, или любая из АДФ-

формирующей, ГДФ-формирующей или АМФ-формирующей ацил-КоА-синтетазы/синтазы/лигазы, или киназа и фосфотрансацилаза жирных кислот с короткой цепью.

Более предпочтительно микроорганизм(ы) дополнительно экспрессирует один или несколько из следующих ферментов: 2-кетоизовалератдегидрогеназа, изобутират-КоА-лигаза, АДФ-формирующая, ГДФ-формирующая или АМФ-формирующая ацил-КоА-синтетаза/синтаза/лигаза или киназа и фосфотрансацилаза жирных кислот с короткой цепью.

Наиболее предпочтительно, микроорганизм(ы) дополнительно экспрессирует изобутирил-КоА-синтетазу, конкретно *AcsA Pseudomonas chloraphis*, конкретно B23 *Pseudomonas chloraphis*.

В отношении четвертого, шестого, седьмого, восьмого и дополнительных аспектах, микроорганизмы-хозяева предпочтительно представляют собой бактерии, где примеры подходящих бактерий включают: энтеробактерии, принадлежащие протобактериям родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Morganella* или т.п., так называемые коринеформные бактерии, принадлежащие родам *Brevibacterium*, *Corynebacterium* или *Microbacterium*, и бактерии, принадлежащие родам *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Hydrogenobacter*, *Methanococcus*, *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Axorhizobium*, *Azotobacter*, *Anaplasma*, *Bacteroides*, *Bartonella*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Calymatobacterium*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Chlamydomonas*, *Clostridium*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Enterococcus*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Gardnerella*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Methanobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Pasteurella*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rickettsia*, *Rochalimaea*, *Rothia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Vibrio*, *Wolbachia*, *Yersinia* или т.п.

Иллюстративные бактерии включают виды, выбранные из *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Rhizobium etli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Gluconobacter oxydans*, *Zymomonas mobilis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptomyces coelicolor*, *Clostridium acetobutylicum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Hydrogenobacter thermophilus*, *Methanococcus jannaschii* и *Pseudomonas putida*.

В отношении четвертого, шестого, седьмого, восьмого и дополнительных аспектов предпочтительно бактерия представляет собой *Escherichia coli*.

Иллюстративные дрожжи или грибы включают дрожжи или грибы, принадлежащие родам *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Pichia*, *Cryptococcus* или т.п. Иллюстративные виды дрожжей или грибов включают виды, выбранные из *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris* или т.п.

Один или несколько микроорганизмов по любому из четвертого, шестого, седьмого, восьмого или дополнительных аспектов можно генетически модифицировать для увеличения или уменьшения активности указанных выше природных или генетически сконструированных ферментов.

Предпочтительно микроорганизм(ы) генетически конструируют для увеличения продукции метакриловой кислоты и/или ее производных.

Увеличение продукции метакриловой кислоты и/или ее производных может включать проведение модификаций существующих клеточных метаболических процессов, нуклеиновых кислот и/или белков, используя различные способы генетической инженерии, известные в данной области. Увеличение продукции метакриловой кислоты и/или ее производных также может включать модификацию микроорганизма(ов) для экспрессии в микроорганизме(ах) одного или нескольких гетерологичных генов. Они могут включать гены, кодирующие ферменты требуемого пути до метакриловой кислоты из углеродного сырья, такие как указаны в настоящем документе, или могут включать другие вспомогательные гены, которые действуют, способствуя функционированию и экспрессии ферментов в таких путях непосредственно или опосредованно, как подробно описано ниже.

Таким образом, микроорганизм(ы) можно модифицировать для экспрессии одного или нескольких генов для продукции метакриловой кислоты и/или ее производных и, предпочтительно, микроорганизмы дополнительно модифицируют для увеличения продукции метакриловой кислоты и/или ее производных.

Один или несколько генов, которые можно экспрессировать в микроорганизме(ах), таком как микроорганизм, модифицируемый для продукции метакриловой кислоты и/или ее производных, включают гены, кодирующие любой из следующих ферментов: ACX4 *Arabidopsis thaliana*, оксидазу ацил-КоА с короткой цепью *Arthrobacter nicotianae*, пероксисомальную ацил-КоА-оксидазу *Vigna radiata*, ацил-КоА-оксидазу 4 *Candida tropicalis*, ацил-КоА-оксидазу вида *Candida* и родственные оксидазы с широким диапазоном субстратов, 4-гидроксibenзоил-КоА-тиоэстеразу вида *Arthrobacter*, YciA *Escherichia coli*, YciA *Haemophilus influenzae*, TesA *Escherichia coli*, TesB *Escherichia coli*, 4HBT *Arthrobacter globiformis*, 4HBT штамм CBS-3 вида *Pseudomonas*, EntH *Escherichia coli*, бутирил-КоА ацетоацетат-КоА-трансферазу вида *Clostridium SB4*, бутирил-КоА-ацетоацетат-КоА-трансферазу *Clostridium sticklandii*, бутиратацетоацетат-КоА-трансферазу ATCC824 *Clostridium acetobutylicum*, ацетаткофермент-А-трансферазу ydiF *Escherichia coli*, фосфотрансбутирилазу ATCC824 *Clostridium acetobutylicum*, киназу жирных кислот с разветвленной цепью *Spirochete MA-2*, бутираткиназу *Thermotoga maritima*, бутираткиназу *Clostridium butyricum*, дегидрогеназу ацил-КоА с разветвленной цепью *Pseudomonas putida*, изобутирил-КоА-дегидрогеназу Homo

sapiens, изовалерил-КоА-дегидрогеназу *Arabidopsis thaliana*, электронопереносящий флавопротеин *H. sapiens*, электронопереносящий флавопротеин *Sus scrofa*, электронопереносящий флавопротеин *Arabidopsis thaliana*, электронопереносящий флавопротеин *Pseudomonas putida*, электронопереносящий флавопротеин *Parasoccus denitrificans*, оксидоредуктазу электронопереносящего флавопротеина:убихинона *H. sapiens*, оксидоредуктазу электронопереносящего флавопротеина:убихинона *Sus scrofa*, оксидоредуктазу электронопереносящего флавопротеина:убихинона *Pseudomonas putida*, оксидоредуктазу электронопереносящего флавопротеина:убихинона *Arabidopsis thaliana*, оксидоредуктазу электронопереносящего флавопротеина:убихинона *Rhodobacter sphaeroides*, оксидоредуктазу электронопереносящего флавопротеина:убихинона *Parasoccus denitrificans*.

Один или несколько генов, которые можно экспрессировать в микроорганизме(ах), который модифицирован для увеличения продукции метакриловой кислоты и/или ее производных, включают гены, кодирующие любой из следующих ферментов: *AcsA Pseudomonas chlororaphis*; *bkdA1*, *bkdA2*, *bkdB* и *lpdV Bacillus subtilis*; *bkdA1*, *bkdA2*, *bkdB* и *lpdV Pseudomonas putida*; *alsS Bacillus subtilis*, *ilvD Escherichia coli*, *ilvC Escherichia coli*, *ilvB Escherichia coli*, *ilvN Escherichia coli*, *ilvI Escherichia coli*, *ilvG Escherichia coli*, *ilvM Escherichia coli*, *ilvH Escherichia coli* и *ilvN Escherichia coli* с мутациями G14D и S17F, *ilvC Corynebacterium glutamicum R*, несущей мутации S34G, L48E и R49F, *ilvB* и *ilvN Corynebacterium R* и *ilvN Corynebacterium R*, несущей мутацию G156E, а также гомологи из других организмов, несущие сходные с описанными выше мутации, для облегчения ингибирования ферментов конечным продуктом и для изменения зависимости кофакторов, при необходимости.

Настоящее изобретение может дополнительно включать модификации, которые уменьшают или устраняют активность фермента, который катализирует синтез соединений, отличных от метакриловой кислоты и/или ее производных вследствие конкуренции за те же субстраты и/или промежуточные соединения в указанных выше путях биосинтеза. Примеры таких ферментов включают *YciA*, *TesA*, *TesB Escherichia coli* и ферменты, кодируемые *fadB*, *ilvA*, *panB*, *leuA*, *ygaZ*, *ygaH*, *aceF*, *aceE*, *lpdA*, *tpiA*, *pfkA*, *pfkB*, *mdh*, *poxB*, *ilvE*, *ldhA* и *lldD Escherichia coli*, а также гомологи других штаммов-хозяев, как описано в настоящем документе.

Настоящее изобретение может дополнительно включать модификации, которые уменьшают или устраняют активность фермента, который обеспечивает метаболизм метакриловой кислоты и/или ее производных или обеспечивает метаболизм промежуточного соединения в указанных выше путях биосинтеза. Примеры таких ферментов, связанных с метаболизмом представляют собой ферменты природного пути деградации валина *E. coli* или другие тиюэстеразы, которые могут разрушать сложные тиюэфирные промежуточные соединения сконструированного пути.

Настоящее изобретение также может дополнительно включать модификации, которые уменьшают или устраняют активность белков, участвующих в других клеточных функциях, которые удаляют промежуточные соединения в указанных выше путях биосинтеза. Примеры таких клеточных функций могут включать механизмы хранения, такие как вакуолярное хранение (например, в дрожжах) или другие внутриклеточные тельца, способные к хранению метаболитов (например, бактериальные микрокомпарменты), периплазма бактерий, или механизмы транспорта, такие как трансмембранные помпы или порины, способные экспортировать метаболиты.

Источники нуклеиновых кислот для генов, кодирующих белки, в частности, ферменты, экспрессируемые в микроорганизме(ах) по настоящему изобретению, могут включать, например, любые виды, где кодируемый продукт гена может катализировать указанную реакцию. Такие виды включают прокариотические и эукариотические организмы, включая в качестве неограничивающих примеров, бактерии, включая архей и эубактерий, и эукариоты, включая дрожжи, растения, насекомых, животных и млекопитающих, включая человека. Иллюстративные виды для таких источников включают, например, *Escherichia coli*, *Homo sapiens*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Methylobacterium extorquens*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Yersinia frederiksenii*, *Propionibacterium acnes*, *Rattus norvegicus*, *Caenorhabditis elegans*, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baylyi*, вид *Acinetobacter*, *Clostridium kluyveri*, вид *Pseudomonas*, *Thermus thermophilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Oryctolagus cuniculus*, *Clostridium acetobutylicum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Eubacterium barkeri*, *Bacteroides capillosus*, *Anaerotruncus colihominis*, *Natranaerobius thermophilus*, *Campylobacter jejuni*, *Arabidopsis thaliana*, *Corynebacterium glutamicum*, *Sus scrofa*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Streptomyces coelicolor*, *Methylobium petroleiphilum*, *Streptomyces cinnamomensis*, *Streptomyces avermitilis*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Haloarcula marismortui*, *Pyrobaculum aerophilum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium cochlearium*, *Clostridium tetanomorphum*, *Clostridium tetani*, *Citrobacter amalonaticus*, *Ralstonia eutropha*, *Mus musculus*, *Bos taurus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Morganella morganii*, *Clostridium pasteurianum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Xanthobacter autotrophicus*, *Clostridium propionicum*, *Megasphaera elsdenii*, *Aspergillus terreus*, *Candida*, *Sulfolobus tokodaii*, *Metallophthora sedula*, *Chloroflexus aurantiacus*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Acidaminococcus fermentans*, *Helicobacter pylori*, а также другие иллюстративные виды, описываемые в настоящем документе или доступные в качестве организмов-источников соответствующих генов.

Следует отметить, что один или несколько генов, кодирующих ферменты, которые можно экспрессировать в микроорганизме(ах) по изобретению, также включают гены, кодирующие варианты указанных ферментов, например, варианты ферментов, которые включают замены, делеции, вставки или до-

бавления одной или нескольких аминокислот в полипептидной последовательности, и где указанный полипептид сохраняет активность немодифицированного фермента. Такие варианты ферментов также включают варианты ферментов, которые обладают сниженной ферментативной активностью по сравнению с немодифицированным ферментом, и ферменты, с модифицированным аллостерическим контролем, например, ilvH *Escherichia coli* с мутациями G14D и S17F, ilvC *Corynebacterium glutamicum* R, несущая мутации S34G, L48E и R49F, ilvB и ilvN *Corynebacterium* R и ilvN *Corynebacterium* R, несущие мутацию G156E.

Способы конструирования и тестирования экспрессии белков в неприродных продуцирующих метакриловую кислоту микроорганизмах можно проводить, например, рекомбинантными способами и способами детекции, хорошо известными в данной области. Описания таких способов можно найти, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001) и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1999).

Экзогенные последовательности нуклеиновой кислоты, вовлеченные в путь продукции метакриловой кислоты и/или ее производных или промежуточных соединений при ее получении, можно вводить в клетку микроорганизма стабильно или транзитивно хорошо известными в данной области способами, включая в качестве неограничивающих примеров, конъюгацию, электропорацию, химическую трансформацию, трансдукцию, трансфекцию и трансформацию посредством ультразвука.

Примеры способов трансформации могут включать обработку клеток микроорганизма(ов)-реципиента хлоридом кальция для увеличения проницаемости для ДНК, и получение компетентных клеток из клеток, которые находятся в фазе роста, с последующей трансформацией ДНК. Альтернативно, также можно использовать способ преобразования клеток-реципиентов ДНК в протопласты или сферопласты, которые могут легко захватывать рекомбинантную ДНК, с последующим введением рекомбинантной ДНК в клетки, который, как известно, применим для *Bacillus subtilis*, актиномицет и дрожжей. Кроме того, трансформацию микроорганизмов также можно проводить посредством электропорации. Такие способы хорошо известны в данной области.

Для экзогенной экспрессии в *E. coli* или клетках других прокариотических микроорганизмов определенные последовательности нуклеиновых кислот в генах или кДНК эукариотических нуклеиновых кислот могут кодировать направляющие сигналы, такие как N-концевые митохондриальные или другие направляющие сигналы, которые при желании можно удалять перед трансформацией в клетки прокариотических микроорганизмов. Например, удаление митохондриальной лидерной последовательности приводит к увеличенной экспрессии в *E. coli* (Hoffmeister et al., *J. Biol. Chem.* 280:4329-4338 (2005)). Для экзогенной экспрессии в дрожжах или клетках других эукариотических микроорганизмов, гены можно экспрессировать в цитозоле без добавления лидерной последовательности, или можно направлять в митохондрии или другие органеллы, или направлять для секреции, посредством добавления подходящей направляющей последовательности, такой как митохондриальная направляющий или секреторный сигнал, подходящий для направления в органеллу. Таким образом, следует понимать, что с экзогенной последовательностью нуклеиновой кислоты для придания требуемых свойств можно проводить соответствующие модификации последовательности нуклеиновой кислоты с удалением или добавлением направляющей последовательности. Кроме того, для достижения оптимизированной экспрессии белков в микроорганизме(ах) гены можно подвергать оптимизации кодонов хорошо известными в данной области способами.

Экспрессирующий вектор или векторы можно конструировать, включая кодирующие один или несколько ферментов пути биосинтеза нуклеиновых кислот, как проиллюстрировано в настоящем документе, функционально связанные с контролирующими экспрессию последовательностями, функциональными в данном микроорганизме(ах). Экспрессирующие векторы, пригодные для применения в микроорганизме(ах) по изобретению, включают, например, плазмиды, космиды, фаговые векторы, вирусные векторы, эписомы и искусственные хромосомы, включая векторы и последовательности отбора или маркеры, функционирующие для обеспечения стабильной интеграции в хромосому хозяина.

Кроме того, экспрессирующие векторы могут содержать один или несколько генов селективных маркеров и пригодные контролирующие экспрессию последовательности. Также гены селективных маркеров, которые, например, обеспечивают устойчивость к антибиотикам или токсинам, дополняют ауксотрофную недостаточность или обеспечивают незаменимые питательные вещества, отсутствующие в средах для культивирования. Контролирующие экспрессию последовательности могут включать конститутивные, индуцибельные или репрессируемые промоторы, энхансеры транскрипции, терминаторы транскрипции, сигналы трансляции и т.п., которые хорошо известны в данной области. Когда необходимо обеспечить коэкспрессию двух или более экзогенных кодирующих последовательностей нуклеиновых кислот, обе последовательности нуклеиновых кислот можно встраивать, например, в один экспрессирующий вектор или в отдельные экспрессирующие векторы. Для экспрессии одного вектора кодирующие нуклеиновые кислоты можно функционально связывать с одной общей контролирующей экспрессию последовательностью или связывать с различными контролирующими экспрессию последовательностями, такими как индуцибельные промоторы и конститутивные промоторы. В определенных вариан-

тах осуществления вектор может содержать два или более промоторов для коэкспрессии нескольких генов или оперонов. В определенных вариантах осуществления гены/опероны можно экспрессировать на одном или нескольких различных векторах с одним или несколькими соответствующими промоторами.

Вектор, используемый для трансформации, может представлять собой вектор, автономно реплицирующийся в клетке микроорганизма(ов). Примеры векторов, автономно реплицирующихся в бактериях Enterobacteriaceae, таких как *E. coli*, могут включать плазмидные векторы pUC19, pUC18, pBR322, RSF1010, pHSG299, pHSG298, pHSG399, pHSG398, pSTV28, pSTV29, pET20b(+), pET28b(+) (векторы pET доступны в Novagen), pLysS, (векторы pHSG и pSTV доступны в Takara Bio Inc.), pMW119, pMW118, pMW219, pMW218 (векторы pMW доступны в Nippon Gene Co., Ltd.) и т.д. и их производные. Кроме того, векторы для коринеформных бактерий могут включать pAM330 (опубликованный патент Японии № 58-67699), pHM1519 (опубликованный патент Японии № 58-77895), pSFK6 (опубликованный патент Японии № 2000-262288), pVK7 (USP2003-0175912A), pAJ655, pAJ611, pAJ1844 (опубликованный патент Японии № 58-192900), pCG1 (опубликованный патент Японии № 57-134500), pCG2 (опубликованный патент Японии № 58-35197), pCG4, pCG11 (опубликованный патент Японии № 57-183799), pHK4 (опубликованный патент Японии № 5-7491) и т.д. Кроме того, векторы для дрожжей могут включать плазмиды дрожжей, например, такие как pD902 или pD905 для *Pichia pastoris* или pD1201, pD1204, pD1205, pD1207, pD1211, pD1214, pD1215, pD1217, pD1218, pD1221, pD1224, pD1225, pD1227, pD1231, pD1234, pD1235, pD1237 для *Saccharomyces cerevisiae*. Гены также можно интегрировать в хромосому хозяина хорошо известными способами (например, Datensko and Wanner (Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 6640-6645)).

Увеличение активности фермента может включать увеличение экспрессии гена-мишени, посредством замены регулирующей экспрессию последовательности гена-мишени, такой как промотор, на геномной ДНК или плазмиде промотором, который обладает нужной силой. Например, как часто используемые промоторы известны промотор thr, промотор lac, промотор trp, промотор trc, промотор pL, промотор tac и т.д. Примеры промоторов с высокой активностью экспрессии в микроорганизмах, таких как бактерии, могут включать промоторы гена фактора элонгации Tu (EF-Tu), tuf, промоторы генов, кодирующих кошаперонин GroES/EL, тиоредоксинредуктазу, фосфоглицератмутазу, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу и т.п. (WO2006/028063, EP1697525). Примеры сильных промоторов и способов оценки силы промоторов хорошо известны в данной области.

Кроме того, в промоторной области гена также можно замещать определенные нуклеотиды так, что промотор получает требуемую силу, как описано в WO 2000/18935. Можно проводить замену регулирующей экспрессию последовательности, например, таким же образом, как при замене генов с использованием чувствительной к температуре плазмиды. Примеры векторов с чувствительным к температуре участком начала репликации, которые можно использовать для *Escherichia coli* или *Pantoea ananatis* могут включать, например, плазмиду pMAN997, описанную в международной публикации WO 1999/03988, ее производные и т.д. Кроме того, замену регулирующей экспрессию последовательности также можно проводить способами, в которых используют линейную ДНК, такими как способ, называемый "интеграция под контролем Red" с использованием Red-рекомбиназы фага λ (Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645), способ с комбинацией способа интеграции под контролем Red и системы вырезания фага λ (Cho, E. H. et al. 2002. J. Bacteriol. 184:5200-5203) (WO2005/010175) и т.д. Модификацию регулирующей экспрессию последовательности можно комбинировать с увеличением числа копий гена.

Кроме того, известно, что замена нескольких нуклеотидов в спейсере между участком связывания рибосомы (RBS) и старт-кодоном, а конкретно, в последовательностях непосредственно выше старт-кодона, кардинально влияет на транслируемость иРНК. Трансляцию можно увеличивать, модифицируя эти последовательности.

Когда ген-мишень вносят в указанные выше плазмиду или хромосому, для экспрессии гена можно использовать любой промотор при условии, что выбран промотор, который функционирует в используемом микроорганизме(ах). Промотор может представлять собой природный промотор гена или модифицированный промотор. Экспрессию гена также можно контролировать, соответственно, выбирая промотор, который эффективно функционирует в выбранном микроорганизме(ах), или приближая области -35 и -10 промотора близко к консенсусной последовательности.

Трансформацию, трансдукцию, конъюгацию или вставку в хромосому экзогенной последовательности нуклеиновой кислоты, вовлеченной в путь метаболизма или синтеза можно подтверждать хорошо известными в данной области способами. Такие способы включают, например, выделение плазмидной или хромосомной ДНК с последующей амплификацией посредством полимеразной цепной реакции конкретной последовательности-мишени или рестрикционного картирования, дополнительных анализов нуклеиновых кислот, таких как "нозерн"-блоттинг или амплификация посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) иРНК, или электрофорез в полиакриламидном геле, или определение ферментативной активности, или иммуноблоттинг на экспрессию продуктов генов, или другие подходящие способы анализа для тестирования экспрессии вводимой последовательности нуклеиновой кислоты или соответ-

вующего ей продукта гена. Специалистам в данной области понятно, что экзогенная нуклеиновая кислота экспрессируется в достаточном количестве, чтобы получить желаемый продукт гена, и также понятно, что уровни экспрессии хорошо известными в данной области способами можно оптимизировать для достижения достаточной экспрессии.

Необязательно один или несколько микроорганизмов по четвертому, шестому, седьмому, восьмому или дополнительным аспектам для применения в любом из указанных выше способов по изобретению можно дополнительно модифицировать, снижая или устраняя активность участвующего в клеточной функции фермента или белка, который:

- (i) отводит материал из путей продукции метакриловой кислоты; и/или
- (ii) обеспечивает метаболизм метакриловой кислоты и/или ее производных.

для уменьшения или устранения активности указанных выше ферментов или белков, мутации для уменьшения или устранения внутриклеточной активности ферментов или белков можно вносить в гены указанных выше ферментов или белков общепринятыми способами случайного или сайт-специфического мутагенеза или генетической инженерии. Примеры мутагенеза могут включать, например, облучение рентгеновскими лучами или ультрафиолетом, обработку мутагеном, таким как N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин, сайт-специфический или случайный мутагенез *in vitro* посредством полимеразной цепной реакции с высокой точностью или внесением ошибок, соответственно, и т.д. Участок на гене, куда вносят мутацию, может находиться в кодирующей области, кодирующей фермент или белок, или в контролирующей экспрессию области, такой как промотор. Примеры способов генетической инженерии могут включать генетическую рекомбинацию, трансдукцию, слияние клеток, нокауты генов и т.д.

Уменьшение или устранение внутриклеточной активности заданных фермента или белка и степень уменьшения можно подтверждать, определяя активность фермента или белка в клеточном экстракте или в его очищенной фракции, получаемой из штамма-кандидата, и сравнивая ее с активностью штамма дикого типа, или определяя формирование заданного продукта в цельных клетках.

Примеры других способов придания или улучшения способности к продукции метакриловой кислоты и/или ее производных и/или ее промежуточных соединений могут включать придание устойчивости к метакриловой кислоте или аналогу органической кислоты, дыхательный ингибитор или т.п. и придание чувствительности к ингибитору синтеза клеточной стенки. Эти способы могут включать, например, выбор устойчивых клеток посредством выращивания с увеличивающимися концентрациями токсического вещества, придание устойчивости к монофторуксусной кислоте, придание устойчивости к аденину или устойчивости к тимину, ослабление уреазы, придание устойчивости к малоновой кислоте, придание устойчивости к бензопиронам или нафтохинонам, придание устойчивости к HOQNO, придание устойчивости к альфа-кетомалоновой кислоте, придание устойчивости к гуанидину, придание чувствительности к пенициллину и т.д., как известно в данной области.

Примеры таких устойчивых бактерий могут включать следующие штаммы: AJ3949 FERM BP-2632 *Brevibacterium flavum*; AJ11628 FERM P-5736 *Corynebacterium glutamicum*; AJ11355 FERM P-5007 *Brevibacterium flavum*; AJ11368 FERM P-5020 *Corynebacterium glutamicum*; AJ11217 FERM P-4318 *Brevibacterium flavum*; AJ11218 FERM P-4319 *Corynebacterium glutamicum*; AJ11564 FERM P-5472 *Brevibacterium flavum*; AJ11439 FERM P-5136 *Brevibacterium flavum*; H7684 FERM BP-3004 *Corynebacterium glutamicum*; AJ11426 FERM P-5123 *Brevibacterium lactofermentum*; AJ11440 FERM P-5137 *Corynebacterium glutamicum* и AJ11796 FERM P-6402 *Brevibacterium lactofermentum*.

Дополнительные способы придания или улучшения способности к продукции метакриловой кислоты и/или ее производных и/или ее промежуточных соединений могут включать придание устойчивости к супрессорам/ингибиторам, придание чувствительности к положительным регуляторам/активаторам или уменьшение необходимости в аллостерической активации ферментов другими соединениями. Например, уменьшение необходимости в аллостерической активации дегидрогеназы кетокислот с разветвленной цепью *Pseudomonas putida* валином, или уменьшение аллостерического ингибирования ацетолактатсинтазы *Escherichia coli*.

Ферментация.

Таким образом, указанные выше способы по изобретению можно проводить, культивируя микроорганизм(ы) по четвертому, шестому, седьмому, восьмому или дополнительным аспектам изобретения, которые способны к продукции в среду промежуточного соединения метакрилил-КоА и/или метакриловой кислоты и/или ее производных, таких как сложные эфиры метакриловой кислоты, соответственно.

Таким образом, соответственно, способы по первому, второму или третьему аспектам изобретения могут дополнительно включать этап культивирования одного или нескольких микроорганизмов с получением метакриловой кислоты и/или ее производных, таких как сложные эфиры метакриловой кислоты.

Предпочтительно указанное культивирование проводят в ферментационной среде.

Таким образом, по девятому аспекту настоящего изобретения предоставлен способ ферментации, включающий культивирование одного или нескольких микроорганизмов по четвертому, пятому, шестому, седьмому, восьмому или дополнительным аспектам в ферментационной среде с получением метакриловой кислоты и/или ее производных, таких как сложные эфиры метакриловой кислоты.

Метакриловая кислота и/или ее производное может находиться в ферментационной среде или в клетках микроорганизма(ов).

Таким образом, соответственно, способы по первому, второму или третьему аспектам изобретения могут дополнительно включать этап выделения метакриловой кислоты и/или промежуточного соединения при ее получении и/или ее производного, такого как сложный эфир метакриловой кислоты, из ферментационной среды или из клеток микроорганизма(ов).

Метакриловая кислота и/или ее производное, такое как сложный эфир метакриловой кислоты, может присутствовать в ферментационной среде при секреции микроорганизмом(ами) метакриловой кислоты и/или ее производного, такого как сложный эфир метакриловой кислоты, как описано выше в настоящем документе.

Метакриловая кислота и/или ее производное, такое как сложный эфир метакриловой кислоты, может присутствовать в клетках микроорганизма(ов) при накоплении микроорганизмом метакриловой кислоты и/или ее производных, таких как сложный эфир метакриловой кислоты, как описано выше в настоящем документе.

Таким образом, соответственно, клетки удаляют из ферментационной среды любыми способами, известными в данной области, такими как фильтрация, центрифугирование и т.п., и метакриловую кислоту или ее соль и/или сложный эфир метакриловой кислоты выделяют из ферментационной среды любыми способами, известными в данной области, такими как перегонка, жидкость-жидкостная экстракция и т.д., соответственно, таким образом, способы по изобретению могут включать дополнительный этап выделения метакриловой кислоты и/или ее производного, такого как сложный эфир метакриловой кислоты, из окружающей среды, это можно реализовывать сначала удалением клеток из среды посредством фильтрации или центрифугирования, а затем выделением метакриловой кислоты и/или ее производного из очищенной среды посредством перегонки или жидкость-жидкостной экстракции.

Необязательно, выделение метакриловой кислоты и/или ее производного, такого как сложный эфир метакриловой кислоты, может дополнительно включать этап высвобождения метакриловой кислоты и/или ее производного, такого как сложный эфир метакриловой кислоты, из клетки, что можно проводить любыми способами, известными в данной области, предпочтительно когда клетку лизируют с высвобождением требуемого продукта, например посредством обработки ультразвуком, гомогенизации, ферментативной обработки, помола в шаровой мельнице, осмотического шока, замораживания-оттаивания, обработки кислотой/щелочью, лизиса фагами и т.д. с последующим сходным способом выделения из ферментационной среды, как подробно описано выше. Таким образом, соответственно, способы по изобретению могут включать дополнительные этапы выделения метакриловой кислоты и/или ее производного, такого как сложный эфир метакриловой кислоты, из клеток, это можно реализовывать посредством лизиса клеток и последующей фильтрации клеточного дебриса с последующим выделением метакриловой кислоты и/или ее производного, такого как сложный эфир метакриловой кислоты.

Соответственно, культивирование микроорганизма требует углеродного сырья, на котором микроорганизм может получать энергию и расти. Таким образом, предпочтительно, микроорганизм(ы) культивируют на углеродном сырье, и способы по первому или второму аспектам изобретения могут дополнительно включать этап культивирования одного или нескольких микроорганизмов, которые способны к продукции метакриловой кислоты и/или ее производных из углеродного сырья.

Предпочтительно культивирование проводят в ферментационной среде, соответственно, окружающей среде, которая окружает микроорганизм(ы), предпочтительно в среде присутствует углеродное сырье, необязательно растворенное или суспендированное в среде, барботируемое через среду и/или смешанное со средой. Таким образом, предпочтительно среда одновременно содержит микроорганизм(ы) и углеродное сырье с любыми буферами и солями.

Таким образом, по десятому аспекту настоящего изобретения предоставлена ферментационная среда, содержащая один или несколько микроорганизмов по четвертому, пятому, шестому, седьмому, восьмому или дополнительным аспектам.

Предпочтительно ферментационная среда дополнительно содержит метакриловую кислоту и/или ее производные, такие как сложные эфиры метакриловой кислоты.

Предпочтительно микроорганизм(ы) продуцируют метакриловую кислоту и/или ее производные, такие как сложные эфиры метакриловой кислоты, с повышенной скоростью относительно базальной скорости, как описано выше, так, что предпочтительно концентрация метакриловой кислоты и/или ее производных, таких как сложные эфиры метакриловой кислоты, находящаяся в среде, после прямой секреции или после лизиса клеток, составляет высокий титр.

Предпочтительно титр метакриловой кислоты и/или ее производных, таких как сложные эфиры метакриловой кислоты, присутствующий в ферментационной среде составляет по меньшей мере 5 мг/л. Например, 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155 мг/л предпочтительно по меньшей мере более 130 мг/л.

Предпочтительно в одном из вариантов осуществления, где метакриловая кислота и/или ее производные, такие как сложные эфиры метакриловой кислоты, накапливаются в микроорганизме(ах), концентрация метакриловой кислоты и/или ее промежуточного соединения и/или ее производных, таких как

сложные эфиры метакриловой кислоты, находящаяся в клетке составляет по меньшей мере 0,05 мМ, более предпочтительно по меньшей мере 0,1 мМ, более предпочтительно по меньшей мере 1 мМ, более предпочтительно по меньшей мере 2 мМ, более предпочтительно по меньшей мере 5 мМ, более предпочтительно по меньшей мере 10 мМ.

Предпочтительно концентрация метакриловой кислоты, или ее промежуточного соединения, и/или ее производных, таких как сложные эфиры метакриловой кислоты, в клетке находится в диапазоне от 10 мМ до приблизительно 300 мМ, более предпочтительно приблизительно от 20 мМ до приблизительно 200 мМ, еще более предпочтительно приблизительно от 30 мМ до приблизительно 100 мМ, наиболее предпочтительно приблизительно от 40 мМ до приблизительно 70 мМ.

Микроорганизм(ы) по изобретению можно культивировать в периодическом, повторном периодическом, периодическом с подпиткой, повторном периодическом с подпиткой или в непрерывном процессе культивирования.

Соответственно, процесс культивирования проводят в среде для культивирования, в других случаях указываемой в настоящем документе как окружающая среда или ферментационная среда. Предпочтительно используют периодический процесс с подпиткой или повторный периодический процесс с подпиткой, где в процессе культивирования подают источник углерода и/или источник азота и/или дополнительные соединения. Более предпочтительно, в процессе культивирования подают источник углерода и/или азота.

Ферментационная среда, в которой культивируют микроорганизм(ы) по настоящему изобретению, может представлять собой любую коммерчески доступную среду, подходящую для требований рассматриваемого организма, при условии, что соответствующие питательные вещества, требуемые для указанного организма, являются лимитирующими. Культивирование может являться аэробным или анаэробным, однако в рамках изобретения, где используют фермент оксидазу, культивирование предпочтительно является аэробным.

Ферментационная среда, соответственно, содержит углеродное сырье, как описано выше, и источник азота, а также дополнительные соединения, необходимые для роста микроорганизма(ов) и/или получения метакриловой кислоты и/или сложного эфира метакриловой кислоты.

Примеры подходящего углеродного сырья, известные в данной области, включают глюкозу, мальтозу, мальтодекстрины, сахарозу, гидролизованный крахмал, крахмал, лигнин, ароматические вещества, синтетический газ или его компоненты, метан, этан, пропан, бутан, мелассу и масла. Предпочтительно углеродное сырье получают из биомассы. Также можно использовать смеси, а также отходы, такие как бытовые отходы, пищевые отходы и лигноцеллюлозные отходы пищевой, лесной или сельскохозяйственной промышленности.

Примеры подходящих источников азота, известных в данной области, включают соевую муку, жидкий кукурузный экстракт, дрожжевой экстракт, аммиак, аммонийные соли, нитратные соли, мочевины, газообразный азот или другие источники азота.

Примеры дополнительных соединений, необходимых для роста микроорганизма(ов), включают антибиотики, фунгициды, антиоксиданты, буферы, фосфатные, сульфатные, магниевые соли, микроэлементы и/или витамины.

Общее количество углеродного сырья и источника азота для добавления в среду может варьировать в зависимости от потребностей микроорганизма(ов) и/или длительности процесса культивирования.

Отношение углеродного сырья и источника азота в среде для культивирования может значительно варьировать.

Дополнительные соединения, необходимые для роста микроорганизма(ов) и/или получения метакриловой кислоты и/или ее производных, таких как сложные эфиры метакриловой кислоты, такие как фосфат, сульфат или микроэлементы, можно добавлять в количествах, которые могут варьировать у разных классов микроорганизмов, т.е. у грибов, дрожжей и бактерий. Кроме того, количество дополнительного соединения для добавления можно определять по тому, получают ли метакриловую кислоту и/или ее производные, такие как сложные эфиры метакриловой кислоты, и какие пути используют для этого.

Как правило, количество каждого компонента ферментационной среды, необходимого для роста микроорганизма, устанавливают, определяя результат роста на питательном веществе и проводя дополнительную оценку относительно количества углеродного сырья, используемого в процессе культивирования, так как количество получаемой биомассы преимущественно определяет количество используемого углеродного сырья и ограничения питательными веществами налагаемые при любом режиме подачи питательных веществ.

Процесс культивирования по изобретению предпочтительно проводят в промышленном масштабе. Процесс в промышленном масштабе понимают, как включающий процесс культивирования в одном или нескольких ферментерах в масштабе объемов, который составляет $\geq 0,01 \text{ м}^3$, предпочтительно $\geq 0,1 \text{ м}^3$, предпочтительно $\geq 0,5 \text{ м}^3$, предпочтительно $\geq 5 \text{ м}^3$, предпочтительно $\geq 10 \text{ м}^3$, более предпочтительно $\geq 25 \text{ м}^3$, более предпочтительно $\geq 50 \text{ м}^3$, более предпочтительно $\geq 100 \text{ м}^3$, наиболее предпочтительно $\geq 200 \text{ м}^3$.

Предпочтительно, культивирование микроорганизма(ов) по изобретению, как правило, проводят в биореактор. Как правило, под "биореактором" понимают контейнер, в котором культивируют микроорганизмы в промыш-

ленном масштабе. Биореакторы могут быть любого размера и формы и могут содержать входные отверстия для подачи питательных веществ, дополнительных соединений для роста, свежей среды, углеродного сырья, добавок газов, в качестве неограничивающих примеров, таких как, воздух, азот, кислород или диоксид углерода. Биореакторы также могут содержать выходные отверстия для удаления объемов среды для культивирования для выделения метакриловой кислоты и/или сложного эфира метакриловой кислоты или из самой ферментационной среды, или из микроорганизма(ов). Биореактор предпочтительно содержит выходное отверстие для получения образцов культуры. Как правило, биореактор можно конфигурировать для перемешивания ферментационной среды, например, посредством взбалтывания, качания, встряхивания, переворачивания, барботирования газа через культуры и т.д. Альтернативно, некоторые непрерывные культуры не требуют перемешивания, например, микрореакторные системы с использованием системы с закупоривающим потоком. Биореакторы широко распространены и хорошо известны в данной области, и их примеры можно найти в стандартных руководствах, таких как "Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Второе издание" (1989) Авторы: Wulf Cruegar и Annelise Crueger, переведено Thomas D. Brock Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.

Таким образом, по одиннадцатому аспекту изобретения предоставлен биореактор, содержащий один или несколько микроорганизмов по четвертому, пятому, шестому, седьмому, восьмому или дополнительным аспектам и/или ферментационную среду по десятому аспекту.

Необязательно, биореактор может содержать множество различных микроорганизмов по настоящему изобретению.

Предпочтительно, биореактор содержит только микроорганизм(ы), способный к проведению способа по изобретению.

Более предпочтительно биореактор содержит только микроорганизм(ы) одного вида так, чтобы всегда можно было использовать одинаковые условия культивирования.

Сырье из биомассы.

Предпочтительно используемая биомасса содержит большое количество углеводов, особенно предпочтительны углеводы, которые являются источниками C_5 - или C_6 -сахаров, содержащих углерод газов или ароматических веществ, предпочтительно C_5 - или C_6 -сахаров, более предпочтительно глюкозы, в качестве неограничивающих примеров, такие как крахмал, лигнин, целлюлоза, гликоген, арабиноксилан, хитин или пектин.

Альтернативно, используемая биомасса содержит большое количество жиров, особенно предпочтительны жиры или масла, которые являются источниками глицерина и жирных кислот, конкретно триглицеридов. Подходящие триглицериды включают любое масло или жир, которые легкодоступны из растительного или животного источника. Примеры таких масел и жиров включают: пальмовое масло, льняное масло, рапсовое масло, свиное сало, сливочное масло, жир сельди, кокосовое масло, растительное масло, подсолнечное масло, касторовое масло, соевое масло, оливковое масло, масло какао, ги, ворвань и т.д.

Биомасса может состоять из одного или нескольких различных источников биомассы. Примеры подходящих источников биомассы являются следующими: первичная древесина, сельскохозяйственная культура, используемая в качестве источника энергии, сельскохозяйственные остатки, пищевые отходы, бытовые отходы и промышленные отходы или сопутствующие продукты.

Источники биомассы из первичной древесины в качестве неограничивающих примеров могут включать: древесные стружки; кору; обломки; необработанный лесоматериал; древесные опилки; древесные гранулы или брикеты.

Источники биомассы из сельскохозяйственных культур, используемых в качестве источника энергии, в качестве неограничивающих примеров могут включать: кустарники или леса с коротким оборотом рубки; недревесные травы, такие как мискантус, конопля, просо прутьевидное, тростник или рожь;

сельскохозяйственные культуры, такие как сахар, крахмал или масличные культуры; или водные растения, такие как микро- или макроводоросли, и сорняки.

Сельскохозяйственные остатки в качестве неограничивающих примеров могут включать; выжимку; солому; кукурузную солому; муку; зерна; куриный помет; навоз; взвесь; синтетический газ или силос.

Пищевые отходы в качестве неограничивающих примеров могут включать: шелуху/кожу; скорлупу; жмых; кочерыжку; косточки/семечки; несъедобные части животных или рыб; мякоть из сока и после экстракции масла; пивные дробины или хмель из пивоварения; кухонные отходы; сало, или масла, или жиры.

Промышленные отходы в качестве неограничивающих примеров могут включать: необработанное дерево, включая грузовые поддоны, обработанное дерево, сланцевые газы, композиты из дерева включая MDF/OSD, древесные слоистые пластики, бумажные масса/сечка/отходы; текстильные изделия, включая волокна/пряжу/выходящие продукты; или осадки сточных вод.

Дополнительные продукты.

Кроме того, предусмотрено получение других пригодных органических соединений, например, производных метакриловой кислоты, таких как ее различные сложные эфиры. Таким образом, продукт метакриловой кислоты можно этерифицировать с получением ее сложного эфира. Потенциальные сложные эфиры можно выбирать из C_1 - C_{20} -алкиловых или C_2 - C_{12} гидроксиалкиловых, глицидиловых, изоборниловых, диметиламиноэтиловых, трипропиленгликолевых сложных эфиров. Наиболее предпочтительно спирты или алкены, используемые для получения

сложных эфиров, можно получать из биоисточников, например, биометанол, биоэтанол, биобутанол. Предпочтительные сложные эфиры представляют собой этил-, н-бутил-, изо-бутил-, гидроксиметил-, гидроксипропил- или метилметакрилат, наиболее предпочтительно, метилметакрилат или бутилметакрилат.

Предпочтительно метакриловую кислоту преобразуют в алкил- или гидроксикалкиметакрилат посредством реакции этерификации. Подходящие условия реакции для такого преобразования хорошо известны в данной области и описаны вместе с получением метакриловой кислоты в WO/2012/069813.

По двенадцатому аспекту настоящего изобретения предоставлен способ получения полимеров или сополимеров метакриловой кислоты или сложных эфиров метакриловой кислоты, включающий этапы:

- (i) получения метакриловой кислоты и/или ее производных по первому, второму или третьему аспектам или дополнительным аспектам изобретения;
- (ii) необязательной этерификации метакриловой кислоты, полученной в (i), с получением сложного эфира метакриловой кислоты;
- (iii) полимеризации метакриловой кислоты и/или ее производных, полученных в (i) и/или, если присутствует, сложного эфира, полученного в (ii), необязательно с одним или несколькими сомономерами с получением их полимеров или сополимеров.

Этап (i) может включать любое из дополнительных свойств, описанных в отношении первого, второго и третьего аспектов выше в настоящем документе, в комбинации со свойствами по двенадцатому аспекту.

Предпочтительно, сложный эфир метакриловой кислоты из (ii) выше выбран из C_1 - C_{20} -алкиловых или C_2 - C_{12} гидроксикалкиховых, глицидиловых, изоборниловых, диметиламиноэтиловых, трипропиленгликолевых сложных эфиров, более предпочтительно, этил-, н-бутил-, i-бутил-, гидроксиметил-, гидроксипропил- или метилметакрилата, наиболее предпочтительно, метилметакрилата, этилметакрилата, бутилметакрилата или бутилметакрилата.

Таким образом, по дополнительному аспекту настоящего изобретения предоставлен способ получения полимеров или сополимеров сложных эфиров метакриловой кислоты, включающий этапы:

- (i) получения сложных эфиров метакриловой кислоты по третьему аспекту или дополнительным аспектам изобретения;
- (ii) полимеризации метакриловой кислоты и/или ее производных, полученных в (i), необязательно с одним или несколькими сомономерами, с получением их полимеров или сополимеров.

Этап (i) может включать любое из дополнительных свойств, описанных в отношении третьего аспекта выше в настоящем документе, в комбинации со свойствами по двенадцатому аспекту.

Преимущественно, такие полимеры содержат существенную долю, если не все, остатков мономеров, полученных из источника, отличного от ископаемых видов топлива.

В любом случае, предпочтительные сомомеры включают, например, моноэтиленненасыщенные карбоновые кислоты и дикарбоновые кислоты и их производные, такие как сложные эфиры, амиды и ангидриды.

Особенно предпочтительные сомомеры представляют собой акриловую кислоту, метилакрилат, этилакрилат, пропилакрилат, н-бутилакрилат, изобутилакрилат, трет-бутилакрилат, 2-этилгексилакрилат, гидроксипропилакрилат, изоборнилакрилат, метакриловую кислоту, метилметакрилат, этилметакрилат, пропилакрилат, н-бутилметакрилат, изобутилметакрилат, трет-бутилметакрилат, 2-этилгексилметакрилат, гидроксипропилметакрилат, лаурилметакрилат, глицидилметакрилат, гидроксипропилметакрилат, изоборнилметакрилат, диметиламиноэтилметакрилат, трипропиленгликольдиакрилат, стирол, α -метилстирол, винилацетат, изоцианаты, включая толуолдиизоцианат и п,p'-метиленидифенилдиизоцианат, акрилонитрил, бутадиен, бутадиен и стирол (MBS) и ABS при условии, что ни один из приведенных выше сомономеров не является мономером, выбранным из метакриловой кислоты или сложного эфира метакриловой кислоты в (i) или (ii) выше в любой данной сополимеризации указанного кислотного мономера или сложного эфира в (i) или указанного сложноэфирного мономера в (ii) с одним или несколькими сомономерами.

Понятно, что также можно использовать смеси различных сомономеров. Сами сомомеры можно получать тем же способом, что и мономеры из (i) или (ii) выше, или не получать им.

По двенадцатому аспекту настоящего изобретения предоставлены гомополимеры или сополимеры полиметакриловой кислоты, полиметилметакрилата (PMMA) и полибутилметакрилата, получаемые способом по одиннадцатому аспекту изобретения, описанного в настоящем документе.

Примеры

Далее изобретение проиллюстрировано на основании приводимых ниже неограничивающих примеров и фигур, где:

на фиг. 1 представлена диаграмма Лайнуивера-Берка для описания кинетических характеристик меченной на С-конце гексагистидином 4-гидроксibenзоил-КоА-тиоэстеразы ($75 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$) вида *Arthrobacter SU* с метакрилил-КоА в качестве субстрата;

на фиг. 2 представлена диаграмма Лайнуивера-Берка для описания кинетических характеристик меченной на С-конце гексагистидином 4-гидроксibenзоил-КоА-тиоэстеразы ($1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$) вида *Arthrobacter SU* с изобутирил-КоА в качестве субстрата;

на фиг. 3 представлены результаты ВЭЖХ для нанесенных стандартов изобутирил-КоА (основной пик на 32,2 мин и второстепенный пик на 32,9 мин), метакрилил-КоА (основной пик на 30,8 мин и второстепенный пик на 31,6 мин), метакриловой кислоты (пик на 13,5 мин) и кофермента-А (основной пик на 11 мин и второстепенный пик на 12 мин) с использованием способа ВЭЖХ для определения активности оксидазы ацил-КоА с короткой цепью (АСХ4) *Arabidopsis thaliana* в отношении окисления изобутирил-КоА в метакрилил-КоА *in vitro*. Флавинадениндинуклеотид элюировал на 27,8 мин, и его использовали в качестве внутреннего стандарта для изобутирил-КоА и метакрилил-КоА;

на фиг. 4 представлен результат анализа ВЭЖХ смеси, содержащей бесклеточный экстракт АСХ4, очищенную меченую на С-конце гексагистицином 4НВТ и флавинадениндинуклеотид в буфере HEPES для анализа, без добавления субстрата в качестве отрицательного контроля;

на фиг. 5 представлен анализ ВЭЖХ анализируемой смеси через 30 мин инкубации бесклеточного экстракта АСХ4 с изобутирил-КоА в буфере HEPES для анализа, содержащем флавинадениндинуклеотид;

на фиг. 6 представлен анализ ВЭЖХ анализируемой смеси через 30 мин инкубации бесклеточного экстракта АСХ4 с изобутирил-КоА в буфере HEPES для анализа, содержащем флавинадениндинуклеотид, в который дополнительно внесли изобутирил-КоА после прекращения закисления реакционной смеси;

на фиг. 7 представлен анализ ВЭЖХ ферментативной реакции преобразование изобутирил-КоА в метакриловую кислоту и кофермент-А под действием бесклеточного экстракта АСХ4 и очищенной меченной на С-конце His 4НВТ;

на фиг. 8 представлена плазмида pET20b(+):4НВТ-АСХ-АcsА, плазмида pET20b(+), содержащая ген 4НВТ, ген АСХ4 и ген АcsА, все под контролем одного промотора T7;

на фиг. 9 представлен анализ SDS-PAGE коэкспрессии 4НВТ, АСХ4 и АcsА в BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):4НВТ-АСХ4-АcsА;

на фиг. 10 представлены результаты ВЭЖХ, проводимой для анализа биотрансформации изомасляной кислоты в метакриловую кислоту и все соответствующие контроли, 20,5 час после индукции, при этом на фиг. 10А представлены результаты экспериментов, проводимых для культуры BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):4НВТ-АСХ4-АcsА, в которую не добавляли изомасляной кислоты; на фигуре 10В представлена культура BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+), в которую не добавляли изомасляной кислоты; на фиг. 10С представлен результат ВЭЖХ 5 мМ стандарта изомасляной кислоты; на фиг. 10D представлен результат ВЭЖХ культуры BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+), которую дополняли изомасляной кислотой (5 мМ) через 1 час после индукции экспрессии рекомбинантного белка; на фиг. 10Е приведен результат ВЭЖХ смеси стандартов изомасляной кислоты (5 мМ) и метакриловой кислоты (200 мкМ) и на фиг. 10F представлен результат ВЭЖХ культуры BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):4НВТ-АСХ4-АcsА, в которую добавляли изомасляную кислоту (5 мМ) через 1 час после индукции экспрессии рекомбинантного белка;

на фиг. 11 представлено изменение концентрации метакриловой кислоты со временем (нижняя линия) в культуре BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):4НВТ-АСХ4-АcsА, которую дополняли изомасляной кислотой, а также изменение $\ln(OD_{600})$ культуры со временем (верхняя линия), после добавления изомасляной кислоты в культуру;

на фиг. 12 представлена плазмида pET20b(+):4НВТ-АСХ4-ppBCKD, плазмида pET20b(+) с оптимизированными кодонами генов, кодирующая 4НВТ штамма SU вида *Arthrobacter*, АСХ4 *Arabidopsis thaliana*, а также гены bkdA1, bkdA2, bkdB и lpdV KT2440 *Pseudomonas putida*, все под контролем одного промотора T7;

на фиг. 13 представлен анализ ВЭЖХ смеси стандартов 2-кетоиизовалериановой кислоты (5 мМ), изомасляной кислоты (5 мМ) и метакриловой кислоты (200 мкМ), где компоненты разделяли посредством изократической элюции с использованием 14% ацетонитрила в 50 мМ KH_2PO_4 , которую подкисляли HCl до pH 2,5, со скоростью потока 1 мл·мин⁻¹;

на фиг. 14 представлен анализ ВЭЖХ культуры отрицательного контрольного штамма BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+), где компоненты разделяли посредством изократической элюции, с использованием 14% ацетонитрила в 50 мМ KH_2PO_4 , которую подкисляли HCl до pH 2,5, со скоростью потока 1 мл·мин⁻¹;

на фиг. 15 представлен анализ ВЭЖХ культуры BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):4НВТ-АСХ4-ppBCKD, где компоненты разделяли посредством изократической элюции, с использованием 14% ацетонитрила в 50 мМ KH_2PO_4 , которую подкисляли HCl до pH 2,5, со скоростью потока 1 мл·мин⁻¹, демонстрирующий продукцию метакриловой кислоты из глюкозы;

на фиг. 16 представлен анализ ВЭЖХ образца культуры BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):4НВТ-АСХ4-ppBCKD, в которую дополнительно добавляли 0,24 мМ готовую метакриловую кислоту, где компоненты разделяли посредством изократической элюции, с использованием 14% ацетонитрила в 50 мМ KH_2PO_4 , которую подкисляли HCl до pH 2,5, со скоростью потока 1 мл·мин⁻¹;

на фиг. 17 представлен анализ ВЭЖХ культуры отрицательного контрольного штамма BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+), которую дополняли 2-кетоиизовалериановой кислотой, где компоненты разде-

ляли посредством изократической элюции, с использованием 14% ацетонитрила в 50 мМ KH_2PO_4 , которую подкисляли HCl до pH 2,5, со скоростью потока 1 мл·мин⁻¹;

на фиг. 18 представлен анализ ВЭЖХ культуры отрицательного контрольного штамма BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b (+):4HBT-ACX4-ppBCKD, которую дополняли 2-кетоизовалериановой кислотой (5 мМ), где компоненты разделяли посредством изократической элюции, с использованием 14% ацетонитрила в 50 мМ KH_2PO_4 , которую подкисляли HCl до pH 2,5, со скоростью потока 1 мл·мин⁻¹, демонстрирующий, что добавление в культуру 2-кетоизовалериановой кислоты увеличивает продукцию метакриловой кислоты этим штаммом;

на фиг. 19 представлен анализ ВЭЖХ образца культуры BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):4HBT-ACX4-ppBCKD, которую дополняли 2-кетоизовалериановой кислотой (5 мМ), в которую дополнительно добавляли 0,24 мМ готовую метакриловую кислоту, где компоненты разделяли посредством изократической элюции, с использованием 14% ацетонитрила в 50 мМ KH_2PO_4 , которую подкисляли HCl до pH 2,5, со скоростью потока 1 мл·мин⁻¹;

на фиг. 20 представлена структура плазмиды pMMA121 для экспрессии белка ACX4 *Arabidopsis thaliana* в *E. coli*;

на фиг. 21 представлено получение метакрилил-КоА из изобутирил-КоА с использованием белка ACX4 *Arabidopsis thaliana*, получаемого из рекомбинантной *E. coli* из примера 5;

на фиг. 22 представлен анализ SDS-PAGE фракций рекомбинантной *E. coli* из примера 5, содержащих белок ACX4 *Arabidopsis thaliana*;

на фиг. 23 представлена структура плазмид pWA008, pMMA133 и pMMA134 для экспрессии AAT яблока (MrAAT1), ACX4 *Arabidopsis* и bkdA1, bkdA2, bkdB и lpdV: генов комплекса BCKAD штамма PA01 *Pseudomonas aeruginosa* в рекомбинантной *E. coli*;

на фиг. 24 представлено получение бутилметакрилата из 2-кетоизовалерата и бутанола посредством анализа ВЭЖХ образца культуры продукции рекомбинантной *E. coli*, экспрессирующей плазмиду pMMA134.

Пример 1. Селективный гидролиз метакрилил-КоА.

Пример 2. Окисление изобутирил-КоА в метакрилил-КоА и преобразование изобутирил-КоА в метакриловую кислоту и кофермент-А в ферментативной реакции *in vitro*.

Пример 3. Биотрансформация изомасляной кислоты в метакриловую кислоту в цельных клетках.

Пример 4. Получение метакриловой кислоты из глюкозы через промежуточное соединение 2-кетоизовалерат в цельных клетках.

Пример 5. Получение бутилметакрилата из 2-кетоизовалерата посредством рекомбинантной *Escherichia coli* в цельных клетках.

1.1 Материалы для примеров 1-4.

Перечислены бактериальные штаммы, используемые во всех примерах с первого по четвертый, а также среды для выращивания и агаровые чашки, использованные во всех экспериментах. В таблице праймеров приведены все праймеры, используемые в настоящем исследовании, а в таблице плазмид приведены все плазмиды, используемые и сконструированные в течение этого исследования.

1.1.1. Бактериальные штаммы.

В качестве клонирующей плазмиды хозяина использовали JM107 *E. coli*, тогда как в качестве хозяина для экспрессии генов использовали BL21 (DE3) pLysS *E. coli*.

1.1.2. Бактериальные среды для выращивания и чашки с питательным агаром.

1.1.2.1. Бульон Лурия-Бертани (среда LB).

Всегда, когда указана среда LB, использовали высокосолевою среду Лурия-Бертани (Melford) (25 г·л⁻¹), где 25 г высокосолеовой среды LB в 1 литре содержит пептон из расщепленного казеина (10 г·л⁻¹), дрожжевой экстракт (5 г·л⁻¹) и хлорид натрия (10 г·л⁻¹).

Среду LB часто дополняли карбенициллином (50 мкг·мл⁻¹), хлорамфениколом (34 мкг·мл⁻¹) и/или глюкозой (1% мас./об.). Среду LB стерилизовали в автоклаве, тогда как исходные растворы глюкозы (20% мас./об.) в воде, карбенициллина (100 мг·мл⁻¹) в воде и хлорамфеникола (34 мг·мл⁻¹) в этаноле стерильно фильтровали и добавляли отдельно.

1.1.2.2. Минимальная среда MSX.

Среду MSX получали посредством комбинирования среды MSA (760 мл·л⁻¹), среды MSB (200 мл·л⁻¹) и 12,5% (мас./об.) исходного раствора глюкозы (40 мл·л⁻¹) при комнатной температуре. Среда MSB составляли из NH_4Cl (15 г·л⁻¹) и $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,0 г·л⁻¹) и стерилизовали в автоклаве. Среду MSA составляли из KH_2PO_4 (7,89 г·л⁻¹), микроэлементов Vishniac (2,63 мл·л⁻¹) и добавляли раствор KOH до достижения pH 7,0 с последующей стерилизацией MSA в автоклаве. Микроэлементы Vishniac получали, как описано ранее (Vishniac W., Santer M. THE THIOBACILLI, Bacteriological Reviews, 1957; 21 (3):195-213) но с использованием только 3,9 г·л⁻¹ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Глюкозу стерильно фильтровали с использованием 0,22 мкм стерильного фильтра. Среду MSX иногда дополняли рибофлавином (1 мг·л⁻¹) и это осуществляли, сначала растворяя рибофлавин в среде MSB (5 мг·л⁻¹). Затем этот раствор стерильно фильтровали и затем раствор MSB+рибофлавин смешивали с MSA и глюкозой в том же объеме как для одной среды

MSX, с получением MSX, дополненной рибофлавинов. И MSX, и MSX, дополненную рибофлавином, всегда дополняли карбенициллином (50 мкг·мл⁻¹) и хлорамфениколом (34 мкг·мл⁻¹), полученным, как описано ранее для среды LB.

1.1.2.3. Агарозные чашки Лурия-Бертани.

Агарозные чашки Лурия-Бертани получали с использованием высокосолевого среды Лурия-Бертани (Melford) (25 г·л⁻¹) и агара (20 г·л⁻¹). Смесь LB и агара перед заливкой стерилизовали в автоклаве и оставляли охлаждаться в течение 1 часа в 50°C водяной бане. Чашки с LB агаром часто дополняли карбенициллином (50 мкг·мл⁻¹), хлорамфениколом (34 мкг·мл⁻¹) и/или глюкозой (1% мас./об.). Исходные растворы карбенициллина, хлорамфеникола и глюкозы получали, как описано ранее для жидкого бульона Лурия-Бертани, и добавляли к раствору LB агара непосредственно перед заливкой. Исходный раствор глюкозы до его добавления в LB агар предварительно нагревали в 50°C водяной бане в течение 1 часа.

1.1.3. Таблица праймеров и список последовательностей.

ОБОЗНАЧЕНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРАЙМЕРА (от 5' к 3')	SEQ ID
HNT.F	TATACATATGCACCGTACCTCTAACGGTTCTCACGC	2
HNT.R	CTCGAGTCCGTCACGACGCGGACG	3
OE.A.F	ACATATGCACCGTACCTCTAACGGTTC	7
OE.A.R	CTGCCATATCTATATCTCCTGTAGTCACGACGCGGACG	8
OE.B.F	GTGACTAACAGGAGATATAGATATGGCAGTTCTGAGCAGC	9
OE.R.R	CTCGAGATATTATAGCTAGCTTACAGACGGCTACGGGTTG	10
BCKAD.F	GGCCTGTCTAGTGATTTACAGCGG	16
BCKAD.R	CGGCCCTGCAGGTTTCGCGGGAATCAGATGTGC	17
AAT.F	AGGAGATATACCATGAAAAGCTTTTCTGTACTC	18
AAT.R	AGCAGCCGGATCCCTGCAGGACTAGTTTACTGGTGGTGCTAC	19
ACX4.F	CACCAGCCAGTAAGCTAGCAAGGAGATATACCATGGCTG	20
ACX4.R	TCCCTCTGCAGGACTGTTTACAGGCGAGAACGGGTAG	21

SEQ ID NO:1 - последовательность гена с оптимизированными кодонами для 4-гидроксibenзоил-КоА-тиоэстеразы (4HBT) штамма SU вида *Arthrobacter* для экспрессии в *Escherichia coli*.

SEQ ID NO:4 - продукт полимеразной цепной реакции, проводимой для модификации гена 4HBT так, чтобы субклонировать продукт ПЦР в плазмиду pET20b(+) с получением плазмиды pET20b(+):CtHis-4HBT.

SEQ ID NO:5 - ген, кодирующий меченный на C-конце гистидином фермент 4HBT, в плазмиде pET20b(+):CtHis-4HBT.

SEQ ID NO:6 - ген с оптимизированными кодонами, кодирующий оксидазу ацил-КоА с короткой цепью (ACX4) *Arabidopsis thaliana* для экспрессии в *Escherichia coli*.

SEQ ID NO:11 - продукт полимеразной цепной реакции с перекрывающейся достройкой для объединения 4HBT и ACX4 в один полинуклеотид.

SEQ ID NO:12 - ген с оптимизированными кодонами, кодирующий ацил-КоА-синтетазу (AcsA) *Pseudomonas chlororaphis* B23 для экспрессии в *Escherichia coli*.

SEQ ID NO:13 - последовательность, расположенная между и содержащая участки рестрикции NdeI и XhoI в pET20b(+):4HBT-ACX4-AcsA.

SEQ ID NO:14 - полинуклеотид "ppBCKD", синтезированный посредством Biomatik, содержащий четыре гена, кодирующих субъединицы дегидрогеназы кетокислот с разветвленной цепью KT2440 *Pseudomonas putida*, встроенный в плазмиду pBSK::ppBCKD.

SEQ ID NO:15 - последовательность, расположенная между и содержащая участки рестрикции NdeI и XhoI в плазмиде pET20b(+):4HBT-ACX4-ppBCKD.

SEQ ID NO:22 - последовательность экспрессирующего вектора pET16b (Sse), содержащего модифицированный участок рестрикции Sse8387I.

SEQ ID NO:23 - ген с оптимизированными кодонами, кодирующий оксидазу ацил-КоА с короткой цепью (ACX4) *Arabidopsis thaliana* для экспрессии в экспрессирующем векторе pET16b (Sse).

SEQ ID NO:24 - ген с оптимизированными кодонами, кодирующий алкогольацилтрансферазу (AAT) яблока для экспрессии в экспрессирующем векторе pET16b (Sse).

1.1.4. Таблица плазмид.

ОБОЗНАЧЕНИЕ ПЛАЗМИДЫ	ИСТОЧНИК	ОПИСАНИЕ
pBMN::4HBT	Biomatik Corporation	Клонирующий вектор, придающий устойчивость к ампициллину, содержащий ген с оптимизированными кодонами, кодирующий 4HBT, фланкированный участками рестрикции NdeI и NotI.
pBMN::AcsA	Biomatik Corporation	Клонирующий вектор, придающий устойчивость к ампициллину, содержащий ген с оптимизированными кодонами, кодирующий AcsA, фланкированный на 3'-конце участком рестрикции XhoI и на 5'-конце последовательностью, содержащей участок рестрикции NheI, участок связывания рибосомы, спейсерную последовательность и участок рестрикции NdeI.
pBSK::ppBSKD	Biomatik Corporation	Клонирующий вектор с четырьмя генами, кодирующими комплекс дегидрогеназы
		кетокислот с разветвленной цепью KT2440 <i>Pseudomonas putida</i> , фланкированный на 3'-конце участком рестрикции XhoI и на 5'-конце последовательностью, состоящей из участка рестрикции XbaI, спейсерной последовательности, участка рестрикции NheI, участок связывания рибосомы и второй спейсерной последовательности.
pMA-RQ::ACX4	Life Technologies	Клонирующая плазмида, придающая устойчивость к ампициллину, и содержащая ген с оптимизированными кодонами, кодирующий ACX4 <i>Arabidopsis thaliana</i> , фланкированный на 5'-конце участком рестрикции NdeI и на 3'-конце участком рестрикции XhoI.
pJET1.2	Thermo Scientific	Линейаризованный клонирующий вектор с тупыми концами pJET1.2 Thermo Scientific.
pJET1.2::CtHIS-4HBT	Эта работа	Клонирующий вектор pJET1.2, содержащий продукт полимеразной цепной реакции с заменой стоп-кодона 4HBT последовательностью 5'-GGA-3' с последующим участком XhoI так, что при субклонировании вставки в pET20b(+), получаемый ген кодирует 4HBT с С-концевой His-меткой, добавленной к концу, с трипептидным линкером между ними.
pJET1.2::4HBT-ACX4	Эта работа	Клонирующий вектор pJET1.2, содержащий продукт полимеразной цепной реакции с перекрывающейся достройкой, который лигирован с генами 4HBT и ACX4 в один полинуклеотид с новым участком связывания рибосомы между этими двумя генами.
pET20b(+)	Novagen	Экспрессирующий вектор pET20b(+) Novagen.
pET20b(+)::4HBT	Эта работа	Экспрессирующий вектор pET20b(+), содержащий ген с оптимизированными кодонами, кодирующий 4HBT штамма SU вида <i>Arthrobacter</i> между участками рестрикции NdeI и NotI.
pET20b(+)::CtHIS-4HBT	Эта работа	Экспрессирующий вектор pET20b(+) со вставкой из pJET1.2::CtHIS-4HBT, субклонированной между участками рестрикции NdeI и XhoI, для экспрессии

		4НВТ с пептидом Gly-Leu-Glu-His-His-His-His-His-His, добавленным на С-конце каждой субъединицы.
pET20b(+)::ACX4	Эта работа	Экспрессирующий вектор pET20b(+), содержащий ген с оптимизированными кодонами, кодирующий оксидазу ацил-KoA с короткой цепью <i>Arabidopsis thaliana</i> , клонированную между участками рестрикции NdeI и XhoI.
pET20b(+)::AcsA	Эта работа	Экспрессирующий вектор pET20b(+), содержащий ген с оптимизированными кодонами, кодирующий AcsA, клонированный между участками рестрикции NdeI и XhoI.
pET20b(+)::4НВТ-ACX4	Эта работа	Экспрессирующий вектор pET20b(+), содержащий гены 4НВТ и ACX4, субклонированные в виде одного полинуклеотида из плазмиды pJET1.2::4НВТ-ACX4 в плазмиду pET20b(+) между участками рестрикции NdeI и XhoI так, что формируется экспрессионная единица для коэкспрессии 4НВТ и ACX4, и способная к введению второй вставки между вновь внесенными участком NheI и участком XhoI.
pET20b(+)::4НВТ-ACX4-AcsA	Эта работа	Экспрессирующий вектор pET20b(+)::4НВТ-ACX4, содержащий ген AcsA, субклонированный из плазмиды pBMH::AcsA, между его участками NheI и XhoI.
pET20b(+)::ppBCKD	Эта работа	Экспрессирующий вектор pET20b(+), содержащий четыре гена, кодирующих комплекс ppBCKD, субклонированный из плазмиды pBSK::ppBCKD, между участками рестрикции XbaI и XhoI.
pET20b(+)::4НВТ-ACX4-ppBCKD	Эта работа	Экспрессирующий вектор pET20b(+)::4НВТ-ACX4, содержащий четыре гена, кодирующих комплекс ppBCKD, субклонированный из плазмиды pBSK::ppBCKD, между его участками рестрикции NheI и XhoI.
pET16b (Sse)	Эта работа	Экспрессирующий вектор pET16b с модифицированным участком рестрикции Sse8387I.
pMMA121	Эта работа	Экспрессирующий вектор pET16b (Sse), содержащий ген ACX4 <i>A.thaliana</i> ,
		оптимизированный для экспрессии в pET16b (Sse), между его участками рестрикции XbaI и Sse8387I.
pWA008	Эта работа	Экспрессирующий вектор pET16b(Sse), содержащий оперон, кодирующий комплекс BSKAD штамма PA01 <i>P. aeruginosa</i> , встроенные между его участками рестрикции NcoI и Sse8387I.
pAAT212	Эта работа	Экспрессирующий вектор pET(Sse), содержащий ген ААТ яблока, оптимизированный для экспрессии в pET16b (Sse), встроенный между его участками рестрикции NcoI и Sse8387I
pMMA133	Эта работа	Плазмида pAAT212, дополнительно содержащая ген ACX4 <i>A.thaliana</i> , оптимизированный для экспрессии в векторе pET16b (Sse), встроенный между участком рестрикции SpeI и геном ААТ.
pMMA134	Эта работа	Плазмиды pMMA133 и pWA008, лигированные друг с другом и содержащие ген ACX4 <i>A.thaliana</i> , оптимизированный для экспрессии в векторе pET16b (Sse), ген ААТ яблока, оптимизированный для экспрессии в векторе pET16b (Sse), и комплекс BSKAD штамма PA01 <i>P. aeruginosa</i> , встроенный между участками рестрикции XbaI и Sse8387I.

1.2. Общие способы для примеров 1-4.

1.2.1. Трансформация плазмид в клонирующего хозяина JM107 E. coli.

Плазмиды (1 нг) трансформировали в JM107 E. coli (50 мкл), которые делали компетентными с использованием набора для трансформации бактерий TransformAid™ Fermentas. Только что трансформированные клетки инкубировали на льду в течение 5 минут, затем наносили на предварительно нагретые чашки с LB агаром, дополненным карбенициллином (50 нг·мкл⁻¹). Чашки инкубировали при 37°C в течение 16 часов.

1.2.2. Рестрикционное расщепление плазмид.

Для выделения вставок генов или полинуклеотидов из плазмид, рестрикционное расщепление

плазмид проводили с использованием ряда рестрикционных эндонуклеаз FastDigest® Fermentas по предоставленным инструкциям. Все реакции рестрикционного расщепления проводили в водяной бане при 37°C в течение 3 часов.

1.2.3. Получение линейного экспрессирующего вектора.

Плазмиды линейаризовали в реакциях рестрикционного расщепления (100 мкл), содержащих плазмидную ДНК (100 нг·мкл⁻¹), буфер FastDigest® Green Fermentas буфер (1X) и рестрикционные эндонуклеазы FastDigest® Fermentas, как описано выше. Линейаризованные векторы очищали посредством электрофореза в агарозном геле и гель-экстракции без начальной тепловой инактивации рестрикционных эндонуклеаз. Затем 5'-фосфаты линейаризованных векторов гидролизировали фосфатазой Antarctic (New England Biolabs) по предоставленным инструкциям.

Дефосфорилированный вектор концентрировали посредством осаждения этанолом, что требовало добавления в образец 3M ацетата натрия, pH 5,2 (добавляемый объем: 1/10 от исходного объема образца) с последующим добавлением абсолютного этанола (добавляемый объем: 2X объем нового образца). Осажденную смесь инкубировали в течение ночи при -20°C. Затем осажденную ДНК центрифугировали в центрифуге Eppendorf miniSpin F-45-12-11 при 13400 об/мин в течение 30 минут. Супернатант удаляли и клеточный осадок промывали 70% (об./об.) этанолом. Затем осадок ДНК центрифугировали на той же центрифуге и при той же скорости, как и ранее в течение дополнительных 10 минут. Супернатант удаляли и осадок ДНК сушили на воздухе в пароуловителе в течение 20 минут с последующим ресуспендированием в не содержащей нуклеазы воде (50 мкл). Концентрацию линейаризованного вектора определяли посредством аналитического электрофореза в агарозном геле.

1.2.4. Электрофорез в агарозном геле и гель-экстракция.

Линейные фрагменты ДНК после расщепления плазмид или амплификации ПЦР очищали посредством электрофореза в агарозном геле. Продукты расщепления или ПЦР наносили на агарозный гель, состоящий из агарозы (1% (мас./об.)), бромистого этидия (1,78 мкМ), Tris-ацетата (4 мМ) и этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (1 мМ). Для разделения полинуклеотидов по длине геля прикладывали разность потенциалов 7В на сантиметр длины геля. ДНК визуализировали в геле с использованием трансиллюминатора и скальпелем вырезали полосы геля, содержащие представляющий интерес полинуклеотид. Полинуклеотид очищали от полосы геля посредством набора для выделения из геля QI-Aquick®. Концентрацию полинуклеотида определяли посредством аналитического электрофореза в агарозном геле.

1.2.5. Лигирование вставок в линейаризованные плазмиды.

Генные вставки лигировали в линейаризованную плазмиду в реакции лигирования (20 мкл). Реакционные смеси для лигирования состояли из генной вставки и линейного вектора (50 нг) в молярном отношении 3:1 для генных вставок менее 3 т.п.н. в длину или в молярном отношении 1:1 для генных вставок более 3 т.п.н. в длину, вместе с ДНК-лигазой T4 (1 единица) и буфером Fermentas для ДНК-лигазы T4 (1X). Лигирование проводили при комнатной температуре в течение 20 минут, и смесь после лигирования (2,5 мкл) использовали в качестве источника плазмиды для трансформации в JM107 E. coli, которую проводили с использованием набор для трансформации бактерий TransformAid Fermentas, как описано ранее. Трансформированные клетки высевали на предварительно нагретые чашки с LB агаром, дополненные карбенициллином, и инкубировали при 37°C в течение 16 часов.

1.2.6. Субклонирование полинуклеотида в экспрессирующий вектор.

Для субклонирования полинуклеотида в новый вектор исходный вектор сначала амплифицировали посредством его трансформации (1 нг) в JM107 E. coli с использованием набора для трансформации бактерий TransformAid™ Fermentas, а затем получая культуру LB (5 мл), дополненную карбенициллином, для каждой из 5 уникальных колонок на агарозной чашке. Культуры в LB+карбенициллине 5×5 мл инкубировали при 37°C с перемешиванием при 250 об./мин в течение 16 часов, и плазмиды выделяли из культур с использованием набора QIAGEN QIAprep® Spin miniprep, как описано в руководстве. Представляющий интерес полинуклеотиды вырезали из каждого препарата плазмиды в реакции рестрикционного расщепления (20 мкл) с использованием 1 мкл требуемой рестрикционной эндонуклеазы для каждого из требуемых 5' и 3' участков клонирования. Рестрикционные фрагменты объединяли друг с другом и полинуклеотид для субклонирования в новый вектор очищали от оставшегося исходного вектора посредством электрофореза в агарозном геле и гель-экстракции. Проводили реакцию лигирования реакция с лигированием полинуклеотидной вставки в линейаризованный экспрессирующий вектор, полученный ранее с комплементарными липкими концами для вставки. Реакцию лигирования (2,5 мкл) использовали в качестве источника плазмиды для трансформации в JM107 E. coli, как уже описано ранее. Экспрессирующую плазмиду амплифицировали посредством инокуляции в культуру LB+карбенициллин (100 мл) одной колонии из чашки с трансформантами, инкубации культуры при 37°C с перемешиванием при 200 об./мин. в течение 16 часов и выделения плазмиды из культуры с использованием набора QIAGEN Plasmid MidiPrep.

1.2.7. Трансформация BL21 (DE3) pLysS E. coli экспрессирующим вектором.

Экспрессирующий вектор (1 нг) трансформировали экспрессирующему хозяину BL21 (DE3) pLysS E. coli. Компетентные клетки приобретали в Novagen и охлажденную на льду кольцевую плазмиду (1 нг) добавляли к охлажденным на льду компетентным клеткам (20 мкл). Смесь для трансформации инкуби-

ровали на льду в течение 5 мин с последующим 30-секундным тепловым шоком при 42°C. После теплового шока клетки инкубировали на льду в течение дополнительных 2 минут. К трансформированным клеткам добавляли среду SOC (Novagen) (80 мкл) и клетки инкубировали при 37°C с перемешиванием при 250 об./мин в течение 60 минут с последующим высеванием на чашки с LB агаром, дополненные карбенициллином (50 мкг·мл⁻¹), хлорамфениколом (34 мкг·мл⁻¹) и глюкозой (1%, мас./об.). Чашки инкубировали при 37°C в течение 16 часов.

1.2.8. Аналитический электрофорез в агарозном геле.

Гомогенность и концентрацию линейной ДНК определяли посредством аналитического электрофореза в агарозном геле. Агарозные гели состояли из агарозы (1% (мас./об.)), бромистого этидия (1,78 мкМ), Tris-ацетата (4 мМ) и ЭДТА (1 мМ). На гель наносили образец ДНК фиксированного объема (5 мкл) вместе с лестничным маркером ДНК GeneRuler™ 1kb Plus (Thermo Scientific) (5 мкл). Для установления концентрации образца интенсивность полосы с образцом визуально сравнивали с интенсивностями полос сходного размера и известной массы лестничного маркера, как описано в руководстве для лестничного маркера ДНК GeneRuler™ 1kb Plus.

1.2.9. Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия.

Из культуры клеток получали образцы (1,5 мл) и клетки осаждали посредством центрифугирования при 5000×g в течение 10 минут. Клеточные осадки ресуспендировали в буфере для лизиса клеток с использованием 100 мкл для каждой единицы OD₆₀₀, которая была у клеток, когда получали образцы. Буфер для лизиса клеток содержал фосфатно-калиевый буфер (100 мМ, pH 7,5), детергент для лизиса клеток BugBuster (Merck-Millipore) (1X), нуклеазу бензоназу (Sigma Aldrich) (0,01%, об./об.) и смесь ингибиторов протеаз (Roche). Ресуспендированные клетки инкубировали в течение 20 минут с перемешиванием при 250 об./мин и центрифугировали при 18000×g в течение 20 минут при 4°C. Нерастворимую фракцию ресуспендировали в фосфатно-калиевом буфере (100 мМ, pH 7,5) с использованием того же объема, который использовали для ресуспендирования клеточного осадка.

Растворимую и нерастворимую фракции смешивали в отношении 1:1 с 2X буфером для образцов Лэммли (Bio-Rad), содержащим β-меркаптоэтанол (5%, об./об.). Образцы кипятили при 100°C в течение 5 минут и наносили на готовый гель Bio-Rad AnyKD TGX. Электрофорез проводили при 200В в подвижном буфере Tris/глицин/SDS (Bio-Rad). Гели отмывали, вымачивая их в двойной дистиллированной воде при комнатной температуре с несильным помешиванием (50 об./мин) в течение 5 минут. Воду удаляли и процедуру отмывки повторяли дополнительные четыре раза. Затем гели окрашивали посредством вымачивания в течение ночи (16 часов) в реагенте для окрашивания гелей EZBlue™ (Sigma-Aldrich) при комнатной температуре с несильным помешиванием в течение 16 часов.

1.3. Пример 1. Получение метакриловой кислоты из метакрилил-КоА.

Фермент 4-гидроксibenzoил-КоА-тиоэстераза (4HBT) штамма SU вида *Arthrobacter* (номер доступа Genbank AAC80224.1, номер доступа Uniprot Q04416, номер EC 3.1.2.23) после поиска в базе данных и литературе тиоэстераз с известной активностью в отношении субстратов, структурно родственных метакрилил-КоА, идентифицирован как тиоэстераза-кандидат для гидролиза метакрилил-КоА.

У гена, кодирующего аминокислотную последовательность 4HBT, оптимизировали кодоны для экспрессии в *E. coli* и проводили его синтез в Biomatik Corporation с участком рестрикции NdeI, интегрированным на 5'-конце, и участком рестрикции NotI, добавленным на 3'-конце.

Синтезированный полинуклеотид (SEQ ID NO:1) помещали в клонирующий вектор pBMH::4HBT и генную вставку 4HBT субклонировали в ранее линеаризованный экспрессирующий вектор pET20b(+) по участкам рестрикции NdeI и NotI с получением pET20b(+):4HBT. Затем вновь сконструированную плазмиду pET20b(+):4HBT трансформировали в BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с получением BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):4HBT.

Для экспрессии фермента 4-гидроксibenzoил-КоА-тиоэстеразы в стартовую культуру (20 мл) среды LB, дополненную глюкозой, карбенициллином и хлорамфениколом сначала инокулировали одну колонию BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):4HBT из чашки с LB агарозой, дополненной глюкозой, хлорамфениколом и карбенициллином. Стартовую культуру инкубировали при 37°C с перемешиванием при 200 об./мин до достижения культурой OD₆₀₀ 1,0. Затем клетки собирали посредством центрифугирования при 5000×g в течение 15 минут при 4°C и использовали для инокуляции промежуточной культуры (100 мл) среды LB, также дополненной глюкозой, карбенициллином и хлорамфениколом. Промежуточную культуру также инкубировали при 37°C с перемешиванием при 200 об./мин до OD₆₀₀ 1,0. Затем клетки промежуточной культуры собирали посредством центрифугирования при 5000×g в течение 15 минут при 4°C с последующим ресуспендированием в свежей среде LB (1 л), снова дополненной глюкозой, карбенициллином и хлорамфениколом в 2,5 л конической встряхиваемой колбе. Эту культуру инкубировали при 37°C с перемешиванием при 200 об./мин до OD₆₀₀ 1,0, а затем индуцировали экспрессию 4HBT посредством добавления изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG) до конечной концентрации 0,4 мМ. Культуру инкубировали в течение дополнительных 5,5 часов в тех же условиях. Культуру по-прежнему разделяли по трем центрифужным пробиркам, а затем клетки собирали посредством центрифуги-

рования при $5000\times g$ в течение 20 минут при 4°C . Образец культуры, полученный до сбора клеток, анализировали посредством SDS-PAGE, который продемонстрировал высокую растворимость и хорошую экспрессию белка. Клеточные осадки в каждой из центрифужных пробирок три раза отмывали в буфере для анализа (50 мл), который состоял из 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоновой кислоты (HEPES) (50 мМ), которую доводили до pH 7,5 гидроксидом калия. Клеточные осадки замораживали при -80°C до лизиса. Этот процесс повторяли для BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+), штамма отрицательного контроля с пустым вектором pET20b(+).

Для получения бесклеточного экстракта фермента 4HBT, один из клеточных осадков BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):4HBT, полученных ранее, ресуспендировали в буфере для анализа HEPES (50 мМ, pH 7,5) и лизировали в разрушающем клетки растворе Constant Systems One Shot. Клеточный лизат центрифугировали при $18000\times g$ в течение 15 минут при 4°C и супернатант после этого центрифугировали при $57750\times g$ в течение дополнительных 60 минут при 4°C . Этот супернатант отмывали с использованием центрифужного концентратора Viva6 VivaSpin с границей пропускания молекулярных масс 10000, центрифугируя при $10000\times g$ при 18°C до уменьшения объема в шесть раз, с последующим повторным разведением в шесть раз в буфере для анализа HEPES и дополнительным 6-кратным уменьшением объема в центрифужном концентраторе. Общую концентрацию белков бесклеточных экстрактов сверхэкспрессирующих культур BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):4HBT определяли с использованием набора для анализа BioRad DC с использованием в качестве белкового стандарта бычьего сывороточного альбумина. Ту же процедуру проделывали для получения бесклеточных экстрактов из клеточного осадка BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+), штамма отрицательного контроля.

Для анализа фермента 4HBT на активность в отношении метакрилил-КоА, сначала получали метакрилил-КоА. Синтез метакрилил-КоА проводили посредством реакции кофермента-A с метакриловым ангидридом. Реакционная смесь состояла из кофермента-A (20 мМ) и метакрилового ангидрида (40 мМ) в натрий-фосфатном буфере (100 мМ, pH 8,5). Реакционную смесь инкубировали на льду и перемешивали каждые 2 минуты в течение 30 минут, и конечную реакционную смесь подкисляли до pH 3,5 соляной кислотой. Побочный продукт в виде метакриловой кислоты и непрореагировавший метакриловый ангидрид удаляли экстракцией 4×10 мл насыщенного водой простого диэтилового эфира. Метакрилил-КоА очищали посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ВЭЖХ-ОФ) на аналитической колонке (колонка C₁₈ Agilent Zorbax Eclipse XDB, 4,6 мм $\times$ 150 мм). Образец (75 мкл) инъецировали в колонку C₁₈ и элюировали в течение 40 минут в линейном градиенте ацетонитрила (1,8% - 13,5%) в 0,1% трифторуксусной кислоте (TFA) со скоростью потока 1 мл·мин⁻¹. Основной пик представлял собой пик, содержащий метакрилил-КоА, и содержащие метакрилил-КоА фракции собирали и объединяли. Ацетонитрил удаляли посредством испарения с применением роторного испарителя (21°C , 3 кПа), оставляя водный раствор метакрилил-КоА и трифторуксусной кислоты. Этот раствор метакрилил-КоА и трифторуксусной кислоты доводили до pH 7 гидроксидом натрия и быстро замораживали жидким азотом с последующей лиофилизацией. TFA удаляли посредством повторного растворения лиофилизированного образца в не содержащей нуклеаз воде (10 мл) и повторения цикла лиофилизация-повторное растворение еще дважды, один раз в 5 мл и в заключение в 1 мл не содержащей нуклеаз воде. Концентрацию метакрилил-КоА определяли по оптической плотности при 260 нм с коэффициентом молярной экстинкции $16800\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Анализ неочищенного фермента 4HBT проводили в кюветах (1 мл), содержащих бесклеточный белковый экстракт (1 мг·мл⁻¹), метакрилил-КоА (приблизительно 100 мкМ), 5'-дифенил-бис-(2-нитробензойную) кислоту (DTNB) (500 мкМ). Реакции начинали добавлением субстрата, и их мониторинг проводили при 412 нм. Анализ ферментов повторяли для бесклеточных экстрактов BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+). Анализ ферментов бесклеточных экстрактов сверхэкспрессирующего 4HBT штамма и контрольного штамма с вектором без вставки также повторяли для изобутирил-КоА в качестве субстрата.

Анализ неочищенного фермента 4HBT демонстрировал, что 4HBT катализировал гидролиз метакрилил-КоА и демонстрировал селективность в отношении метакрилил-КоА по сравнению с изобутирил-КоА в качестве субстрата.

Для лучшей характеристики 4-гидроксibenзоил-КоА-тиоэстеразы фермент метили His так, чтобы его можно было анализировать в виде очищенного фермента в отличие от части бесклеточного экстракта. Для мечения фермента посредством His проводили полимеразную цепную реакцию. Для мечения 4HBT His конструировали прямой и обратный праймеры, ННТ.F (SEQ ID NO:2) и ННТ.R (SEQ ID NO:3), так, чтобы заменить стоп-кодон (5'-TAA-3') гена, кодирующего 4HBT, последовательностью (5'-GGA-3') и сразу за ней внести на 3'-конце участок рестрикции XhoI. Таким образом, при клонировании продукта ПЦР обратно в pET20b(+) между участками рестрикции NdeI и XhoI, получали открытую рамку считывания, кодирующую 4HBT со спейсерной последовательностью глицин-лейцин-глутаминат и C-концевой гексагистидиновой (His) меткой.

Смеси для полимеразной цепной реакции содержали плазмиду pET20b(+):4HBT в качестве матричной ДНК (50 пкг·мкл⁻¹), ДНК-полимеразу KOD (1 единицу), праймер ННТ.F (0,4 мкМ), праймер

ННТ.Р (0,4 мкМ), дезоксиаденозинтрифосфат (dATP) (0,2 мМ), дезокситимидинтрифосфат (dTTP) (0,2 мМ), дезоксицитидинтрифосфат (dCTP) (0,2 мМ), дезоксигуанозинтрифосфат (dGTP) (0,2 мМ), $MgCl_2$ (1 мМ) и буфер № 1 Novagen для ДНК-полимеразы KOD (1X). Смеси ПЦР вносили в термочиклер, запрограммированный на старт при 94°C в течение 3 минут, затем для проведения 30 повторов цикла из 30 секунд плавления при 94°C, 30 секунд отжига при 55°C, 80 секунд достройки при 72°C, с последующим завершением 5 минутами при 72°C.

Продукт ПЦР (SEQ ID NO:4) очищали посредством электрофореза в агарозном геле с последующей гель-экстракцией и лигировали по тупым концам в клонирующий вектор pJET1.2 с получением pJET1.2::CtHis-4HBT. Затем вставку субклонировали из pJET1.2::CtHis-4HBT в pET20b(+) между участками рестрикции NdeI и XhoI с получением pET20b(+):CtHis-4HBT. Затем проводили трансформацию pET20b(+):CtHis-4HBT экспрессирующего хозяина BL21 (DE3) pLysS E. coli с получением экспрессирующего меченную на С-конце гексагистидином 4HBT хозяина, BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):CtHis-4HBT.

Затем получали очищенный меченный на С-конце His фермент 4HBT, сначала выращивая культуры BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):CtHis-4HBT и индуцируя экспрессию таким же образом, как проводили для BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):4HBT. Образец культуры, полученный через 5,5 часов после экспрессии, также продемонстрировал очень хорошую растворимость и высокий уровень экспрессии меченного на С-конце His фермента 4HBT. Клетки собирали посредством разделения культуры клеток на три центрифужные пробирки и центрифугирования при 5000×g в течение 20 минут при 4°C. Однако клеточные осадки не промывали, а вместо этого сразу хранили при -80°C. Бесклеточный экстракт меченной на С-конце гексагистидином 4HBT получали посредством ресуспендирования одного из клеточных осадков BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):CtHis-4HBT в связывающем буфере (6 мл) для колонки FPLC с никелем-сефарозой. Связывающий буфер состоял из NaH_2PO_4 (10 мМ), Na_2HPO_4 (10 мМ), NaCl (500 мМ), имидазола (30 мМ) и был доведен HCl до pH 7,4. К ресуспендированным клеткам добавляли нуклеазу бензоназу® (0,6 мкл) с последующим их лизисом в разрушающем клетки растворе Constant Systems One Shot. Затем клеточный лизат очищали посредством центрифугирования при 18000×g в течение 15 минут при 4°C с последующим центрифугированием супернатанта при 57750×g в течение 60 минут при 4°C. Затем этот супернатант наносили на колонку GE Healthcare HisTrap™ FF Crude (1 мл), которую уравнивали связывающим буфером.

Несвязавшиеся белки смывали с колонки пятью объемами колонки связывающего буфера, а меченный His белок элюировали линейным градиентом концентрации имидазола от 30 мМ до 500 мМ в 20 объемах колонки. Мониторинг элюции белка проводили при 280 нм и фракции проверяли на присутствие и чистоту меченной на С-конце His 4HBT посредством SDS-PAGE. Фракции, содержащие чистый белок CtHis-4HBT объединяли и проводили замену буфера для замены элюирующего буфера фосфатно-калиевым буфером для анализа (100 мМ, pH 7,5) в центрифужном концентраторе Viva6 VivaSpin с границей пропускания молекулярных масс 10000. Для проведения замены буфера объединенные фракции центрифугировали через ультрафильтрационную мембрану центрифужного концентратора при 10000×g при 18°C до уменьшения объема объединенных фракций до 1 мл. Оставшуюся белковую фракцию в шесть раз разбавляли в фосфатно-калиевом буфере для анализа, и образцы концентрировали посредством дополнительного центрифугирования через ультрафильтрационную мембрану в тех же условиях до достижения уменьшения объема в шесть раз. Последнее разбавление в фосфатно-калиевом буфере для анализа и повторное концентрирование проводили еще раз и определяли концентрацию белка CtHis-4HBT по оптической плотности при UV_{280} в спектрофотометре NanoDrop ND1000 с использованием для меченного на С-конце His фермента 4HBT коэффициента молярной экстинкции $20970 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ и молекулярной массы $17516,5 \text{ мг} \cdot \text{ммоль}^{-1}$. Значения коэффициента молярной экстинкции и молекулярной массы определяли с использованием приложения ExPASy ProtParam с использованием перевода генной последовательности, кодирующей меченный на С-конце His фермент 4HBT (SEQ ID NO:5) в плазмиде pET20b(+):CtHis-4HBT, в аминокислоты.

Кинетическую характеристику очищенного меченного на С-конце гексагистидином фермента 4HBT проводили для метакрилил-КоА, который получали ранее, и для изобутирил-КоА (приобретаемого в Sigma Aldrich в виде литиевой соли изобутирил-КоА).

Реакции гидролиза метакрилил-КоА (200 мкл) проводили в 96-луночных планшетах Nunc с использованием очищенного белка CtHis-4HBT ($0,075 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$) и DTNB (0,5 мМ) для контроля реакции. Начальные скорости определяли для исходных концентраций метакрилил-КоА 0,375 мМ, 0,3 мМ, 0,225 мМ, 0,15 мМ и 0,075 мМ. Реакции начинали добавлением фермента.

Изобутирил-КоА реакции гидролиза (200 мкл) также проводили в 96-луночных планшетах Nunc с использованием очищенного белка CtHis-4HBT ($1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$) и DTNB (0,5 мМ) для контроля реакции. Начальные скорости определяли для исходных концентраций изобутирил-КоА 0,5 мМ, 0,4 мМ, 0,3 мМ, 0,2 мМ и 0,1 мМ. Реакции снова начинали добавлением фермента.

Для кинетической характеристики метакрилил-КоА (фиг. 1) и изобутирил-КоА (фиг. 2) строили диаграммы Лайнуивера-Берка. Кинетические константы меченной на С-конце гексагистидином 4HBT

для метакрилил-КоА составляли K_m 1,6 мМ и V_{max} 470 нмоль·мг⁻¹·мин⁻¹, тогда как для изобутирил-КоА они составляли K_m 3 мМ и V_{max} 16,7 нмоль·мг⁻¹·мин⁻¹.

Таким образом, продемонстрировано, что 4НВТ катализирует гидролиз метакрилил-КоА, и ее можно использовать для получения метакриловой кислоты. Так как 4НВТ гидролизует метакрилил-КоА с меньшим значением K_m и более высоким значением V_{max} , чем для изобутирил-КоА, гидролиз метакрилил-КоА посредством 4НВТ преимущественно является высокоселективным.

1.4. Пример 2. Получение метакрилил-КоА и метакриловой кислоты из изобутирил-КоА.

Фермент оксидаза ацил-КоА с короткой цепью (ACX4) *Arabidopsis thaliana* (номер доступа Genbank AB017643.1, номер доступа Uniprot Q96329, номер ЕС 1.3.3.6) посредством поиска в литературе определен, как фермент ацил-КоА-оксидаза с детектируемой активностью в отношении изобутирил-КоА в качестве субстрата при экспрессии в линиях клеток насекомых.

Для определения того, может ли эта оксидаза функционально экспрессироваться в *Escherichia coli* с подходящими уровнями активности в отношении изобутирил-КоА в качестве субстрата для ее интеграции в метаболический путь, у гена, кодирующего аминокислотную последовательность ACX4, оптимизировали кодоны для экспрессии в *E. coli* в Life Technologies с добавлением участка рестрикции NdeI, интегрированного на 5'-конце, и участка рестрикции XhoI на 3'-конце.

Синтезированный полинуклеотид (SEQ ID NO:6) помещали в плазмиду pMA-RQ::ACX4 и генную вставку субклонировали в ранее линейризованный вектор pET20b(+) по участкам рестрикции NdeI и XhoI с получением pET20b(+):ACX4. Затем вновь сконструированную плазмиду pET20b(+):ACX4 трансформировали в BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с получением BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):ACX4.

Для тестирования экспрессии ACX4, в стартовую культуру MSX, дополненную карбенициллином и хлорамфениколом инокулировали одну колонию BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):ACX4 из чашки с LB агарозой, дополненной глюкозой, хлорамфениколом и карбенициллином. Стартовую культуру (20 мл) инкубировали при 37°C с перемешиванием при 200 об./мин в течение 16 часов. Клетки стартовой культуры собирали посредством центрифугирования при 5000×g в течение 15 минут при 4°C, а затем ресуспендировали в свежей среде MSX промежуточной культуры (100 мл), также дополненной хлорамфениколом и карбенициллином. Промежуточную культуру инкубировали при 37°C с перемешиванием при 200 об./мин до OD₆₀₀ 1,0. Затем клетки промежуточной культуры собирали посредством центрифугирования при 5000×g в течение 15 минут при 4°C и ресуспендировали в свежей культуре MSX (1 л), дополненной хлорамфениколом, карбенициллином, а также рибофлавином, в 2,5 л конической встряхиваемой колбе. Культуру инкубировали при 37°C с перемешиванием при 200 об./мин до достижения OD₆₀₀ 0,7, а затем индуцировали экспрессию посредством добавления IPTG до конечной концентрации 0,4 мМ. Культуру инкубировали в течение дополнительных 7 часов в тех же условиях с последующим разделением клеток на три центрифужные пробирки и их сбором посредством центрифугирования при 5000×g в течение 20 минут при 4°C. До сбора клеток получали образец культуры и анализировали посредством SDS-PAGE, который продемонстрировал, хорошую экспрессию белка ACX4 и что приблизительно одна треть белка ACX4 находится в растворимой фракции, а два трети в нерастворимой фракции. Клеточные осадки три раза отмывали в буфере HEPES (50 мМ), который посредством КОН доводили до pH 7,5. Клеточные осадки замораживали при -80°C до лиофилизации. Способ повторяли для штамма отрицательного контроля BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+).

Для получения бесклеточного экстракта фермента ACX4, один из клеточных осадков, который получали ранее, ресуспендировали в буфере HEPES (50 мМ, pH 7,5) (6 мл), который дополняли флавинадениндинуклеотидом (FAD) с конечной концентрацией 10 мкМ. Затем ресуспендированные клетки лизировали в разрушающем клетки растворе Constant Systems One Shot. Лизат центрифугировали при 18000×g в течение 15 минут при 4°C и супернатант после этого дополнительно центрифугировали при 57750 об./мин в течение 60 минут при 4°C. Супернатант концентрировали в центрифужном концентрате Viva6 VivaSpin с границей пропускания молекулярных масс 10000, центрифугируя при 10000×g при 18°C до уменьшения объема концентрата в шесть раз. Концентрат однократно отмывали посредством повторного растворения в шесть раз в буфере HEPES (50 мМ, pH 7,5), который снова дополняли FAD (10 мкМ), с последующим вторым этапом концентрации в центрифужном концентрате посредством уменьшения объема в шесть раз. Общую концентрацию белка в концентрате определяли с использованием набора для анализа белков BioRad DC, с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве белкового стандарта.

Разработан способ аналитической ВЭЖХ для разделения изобутирил-КоА (ИБ-КоА), метакрилил-КоА (МАО-КоА), флавинадениндинуклеотида (FAD), метакриловой кислоты (МАО) и кофермента-А (КоА-SH). Кофермент-А, метакрилил-КоА и изобутирил-КоА элюировали на 11,0 минуте, 30,8 минуте и 32,2 минуте, соответственно. Каждый из кофермента-А, метакрилил-КоА и изобутирил-КоА обладал небольшим концевым (дополнительным) пиком, ассоциированным с основным пиком на 12 минуте, 31,6 минуте и 32,9 минуте, соответственно (фиг. 3). Метакриловая кислота элюировала на 13,5 минуте, а FAD, используемый в анализах неочищенной ACX4 и в качестве внутреннего стандарта для стандартов изобутирил-КоА и метакрилил-КоА, элюировал на 27,8 минуте.

Для обеспечения того, чтобы кофермент-А, метакриловая кислота, изобутирил-КоА и метакрилил-КоА не смешивались с пиками из бесклеточного экстракта, проводили хроматографию контроля без субстрата с использованием бесклеточного экстракта АСХ4 (0,8 мг.мл⁻¹), очищенной StHis-4НВТ (0,6 мг.мл⁻¹) и FAD (10 мкМ) в буфере HEPES. При элюции пиков в моменты элюирования кофермента-А, метакриловой кислоты, метакрилил-КоА или изобутирил-КоА (фиг. 4) не наблюдали.

Тест активности of АСХ4 проводили в 1,5 мл микроцентрифужных пробирках. Реакционные смеси с неочищенным ферментом состояли из бесклеточного экстракта с белком АСХ4 (0,8 мг.мл⁻¹), изобутирил-КоА (500 мкМ) и флавинадениндинуклеотида (10 мкМ) в буфере HEPES (50 мМ, pH 7,5). Реакционную смесь инкубировали при 30°C в 1,5 мл микроцентрифужной пробирке с перемешиванием при 250 об./мин в течение 30 минут, и конечный продукт реакции анализировали посредством аналитической ВЭЖХ (фиг. 5). Основным продуктом являлся метакрилил-КоА с пиком на 30,7 минуте. Концентрация метакриловой кислоты, образующейся в ходе анализа неочищенного фермента, составляла 74 мкМ.

Для подтверждения того, что пик метакрилил-КоА являлся настоящим, и что он не представлял собой пик изобутирил-КоА со сдвинутым временем элюирования, в образец добавляли изобутирил-КоА и снова анализировали посредством ВЭЖХ. Когда образец подкисляли, АСХ4 инактивировалась, и это гарантировало, что никакого дополнительного изобутирил-КоА в метакрилил-КоА не преобразуется. Фактически, добавленный в образец изобутирил-КоА продемонстрировал не только исходный пик метакрилил-КоА, но также и дополнительный пик на 32 минуте с характеристическим конечным пиком изобутирил-КоА (фиг. 6).

Для определения того, может ли метакриловая кислота образовываться из изомасляной кислоты в сопряженной ферментативной реакции, проводили эксперимент, где неочищенную АСХ4 инкубировали с очищенным ферментом StHis-4НВТ. В качестве источника белка для АСХ4 использовали тот же бесклеточный экстракт АСХ4, хотя снова получали очищенную StHis-4НВТ таким же способом, как для кинетической характеристики в примере 1, но проводя в конце замену буфера на буфер HEPES (50 мМ, pH 7,5), вместо используемого ранее фосфатного буфера. Таким образом, неочищенную АСХ4 (0,8 мг.мл⁻¹) совместно инкубировали с очищенной StHis-4НВТ (0,6 мг.мл⁻¹) в буфере HEPES вместе с FAD (10 мкМ) и изобутирил-КоА (500 мкМ). Образец инкубировали при 30°C с перемешиванием при 250 об./мин в течение 30 минут и анализировали посредством ВЭЖХ. Основными продуктами являлись метакриловая кислота и кофермент-А. Пик метакриловой кислоты наблюдали на 13,45 минуте, в то время как основной и второстепенный пики кофермента-А наблюдали на 11,1 минуте и 12,1 минуте, соответственно. Концентрация получаемой метакриловой кислоты при сопряженной ферментативной реакции (фиг. 7) составляла 345 мкМ, в 4,7 раза больше, чем концентрация при анализе только неочищенной АСХ4.

Это подтверждает, что АСХ4 окисляет изобутирил-КоА. Также показано, что комбинация АСХ4 с 4НВТ *in vitro* обеспечивает преобразование изобутирил-КоА в метакриловую кислоту на промышленно применимых уровнях.

1.5. Пример 3. Биотрансформация изомасляной кислоты в метакриловую кислоту в цельных клетках.

Далее в настоящем примере продемонстрирована биотрансформация изомасляной кислоты в метакриловую кислоту с использованием ацил-КоА-синтетазы для активацией изомасляной кислоты коферментом-А с получением изобутирил-КоА, а также продемонстрировано для ацил-КоА-оксидаза АСХ4 *Arabidopsis thaliana* окисление изобутирил-КоА в метакрилил-КоА, а также для ацил-КоА-тиоэстеразы 4НВТ штамма SU вида *Arthrobacter* гидролиз метакрилил-КоА в метакриловую кислоту и кофермент-А.

Ацил-КоА-синтетаза AcsA *Pseudomonas chlororaphis* B23 (номер доступа Genbank: BAD90933.1, номер доступа Uniprot: Q5CD72) после поиска в базе данных и литературе идентифицирована как АМФ-формирующая ацил-КоА-синтетаза, способная к активации изомасляной кислоты в изобутирил-КоА с опубликованной константой Михаэлиса (K_m) 0,14 мМ и числом оборотов (k_{cat}) 10,6 сек⁻¹.

В этом примере авторы демонстрируют конструкцию на основе вектора pET20b(+), pET20b(+):4НВТ-АСХ4-AcsA, для коэкспрессии генов, кодирующих 4НВТ, АСХ4 и AcsA, с одного оперона под контролем промотора T7 pET20b(+), и ее использование для кодирования метаболического пути для биотрансформации изомасляной кислоты в метакриловую кислоту в цельных клетках.

Конструирование оперона проводили в два этапа. Первый этап включал конструирование вектора на основе pET20b(+), pET20b(+):4НВТ-АСХ4, для коэкспрессии генов, кодирующих 4НВТ и АСХ4, тогда как второй этап включал субклонирование в вектор pET20b(+):4НВТ-АСХ4 гена, кодирующего AcsA, со своим собственным участком связывания рибосомы, с конструированием конечной плазмиды pET20b(+):4НВТ-АСХ4-AcsA.

Для конструирования вектора pET20b(+):4НВТ-АСХ4 гены, кодирующие 4НВТ и АСХ4, сначала связывали в один полинуклеотид с новым участком связывания рибосомы между геном, кодирующим 4НВТ, и геном кодирующим АСХ4, для обеспечения эффективной трансляции последнего. Для связывания двух генов друг с другом проводили полимеразную цепную реакцию с перекрывающейся дострой-

кой. Саму полимеразную цепную реакцию с перекрывающейся достройкой проводили в два этапа. Сначала гены, кодирующие 4НВТ и АСХ4, амплифицировали из соответствующих им экспрессирующих векторов, рЕТ20b(+):4НВТ и рЕТ20b(+):АСХ4, в двух отдельных полимеразных цепных реакциях, реакциях "А" и "В".

Праймеры, используемые для полимеразной цепной реакции с перекрывающейся достройкой, представляли собой праймер ОЕ.А.Ф (SEQ ID NO:7), прямой праймер для полимеразной цепной реакции с перекрывающейся достройкой А; праймер ОЕ.А.Р (SEQ ID NO:8), обратный праймер для полимеразной цепной реакции А; праймер ОЕ.В.Ф (SEQ ID NO:9), прямой праймер для полимеразной цепной реакции с перекрывающейся достройкой В и, наконец, ОЕ.В.Р (SEQ ID NO:10), обратный праймер для полимеразной цепной реакции с перекрывающейся достройкой В. Выступ праймера ОЕ.А.Ф сконструирован так, чтобы на 5'-конце новых нуклеотидов находился участок рестрикции NdeI. Выступы праймеров ОЕ.А.Р и ОЕ.В.Ф сконструированы так, чтобы содержать комплементарные друг другу последовательности для обеспечения связывания двух продуктов ПЦР после реакций А и В. Комплементарную последовательность конструировали так, чтобы при связывании двух продуктов ПЦР внести между геном 4НВТ и геном АСХ4 межгенную последовательность, содержащую новый участок связывания рибосомы для последнего гена. Наконец, выступ праймера ОЕ.В.Р конструировали так, чтобы он содержал два участка рестрикции, участок рестрикции NheI и участок рестрикции XhoI. Это позволяет клонировать объединенный полинуклеотид, содержащий гены 4НВТ и АСХ4, в плазмиду рЕТ20b(+) по ее участкам рестрикции NdeI и XhoI с получением рЕТ20b(+):4НВТ-АСХ4 и клонировать ген AcsA в плазмиду рЕТ20b(+):4НВТ-АСХ4 между участками рестрикции NheI и XhoI с получением плазмиды рЕТ20b(+):4НВТ-АСХ4-AcsA. Между участками рестрикции NheI и XhoI в праймере ОЕ.В.Р встраивали богатую аденином и тиминном спейсерную последовательность для снижения температуры отжига праймера так, чтобы она больше соответствовала другим праймерам, и для обеспечения эффективного двойного расщепления по расположенным рядом участкам рестрикции NheI и XhoI.

Смесь для полимеразной цепной реакции А (50 мкл) состояла из рЕТ20b(+):4НВТ (10 пкг.мкл⁻¹) в качестве матричной ДНК, ДНК-полимеразы KOD (1 единица), праймера ОЕ.А.Ф (0,4 мкМ), праймера ОЕ.А.Р (0,4 мкМ), дезоксиаденозинтрифосфата (dATP) (0,2 мМ), дезокситимидинтрифосфата (dTTP) (0,2 мМ), дезоксицитидинтрифосфата (dCTP) (0,2 мМ), дезоксигуанозинтрифосфата (dGTP) (0,2 мМ), MgCl₂ (1 мМ) и буфера Novagen для ДНК-полимеразы KOD (1X).

Смесь для полимеразной цепной реакции В (50 мкл) состояла из рЕТ20b(+):АСХ4 (20 пкг.мкл⁻¹) в качестве матричной ДНК, ДНК-полимеразы KOD (1 единица) праймера ОЕ.В.Ф (0,4 мкМ), праймера ОЕ.В.Р (0,4 мкМ), dATP (0,2 мМ), dTTP (0,2 мМ), dCTP (0,2 мМ), dGTP (0,2 мМ), MgCl₂ (1 мМ) и буфера Novagen для ДНК-полимеразы KOD (1X).

Обе реакции ПЦР проводили параллельно и в одних и тех же условиях, начиная с этапа начальной денатурации при 95°C в течение 3 минут, с последующими 25 циклами, состоящими из этапа денатурация длительностью 15 секунд при 98°C, этапа отжига длительностью 2 секунды при 50°C и этапа достройки длительностью 20 секунд при 72°C. за этими 25 циклами проводили дополнительный этап достройки длительностью 5 минут при 72°C. Два двухцепочечных продукта ПЦР, продукт А и продукт В, очищали посредством электрофореза в агарозном геле и гель-экстракции, и их концентрации определяли посредством аналитического электрофореза в агарозном геле.

Затем продукты ПЦР А и В связывали во второй полимеразной цепной реакции, смесь для которой состояла из продукта ПЦР А (15 нМ), продукта ПЦР В (15 нМ), dATP (0,2 мМ), dTTP (0,2 мМ), dCTP (0,2 мМ), dGTP (0,2 мМ), MgCl₂ (1 мМ), буфера Novagen № 1 для ДНК-полимеразы KOD (1X), диметилсульфоксида (5% (об./об.)) и ДНК-полимеразы KOD (8 нл/мкл). Реакцию проводили в термоблокере, запрограммированном на начало при 95°C в течение 3 минут и продолжение с 15 циклами, состоящими из этапа денатурации длительностью 15 секунд при 98°C, этапа отжига длительностью 2 секунд при 50°C и этапа достройки длительностью 20 секунд при 72°C, и в заключении с дополнительным этапом достройки длительностью 5 минут при 72°C.

После этой программы ПЦР внешний прямой праймер и внешний обратный праймер, используемые в амплификации А и В, соответственно, добавляли непосредственно в раствор объединенных полинуклеотидов (50 мкМ) до конечной концентрации 0,5 мкМ. Затем измененную реакционную смесь для ПЦР подвергали еще одному раунду ПЦР, с термоциклером, запрограммированным на начало в течение 3 минут этапа плавления при 95°C, и продолжение с 15 циклами, состоящими из этапа плавления длительностью 15 секунд при 98°C, этапа отжига длительностью 2 секунды при 55°C и этапа достройки длительностью 20 секунд при 72°C, с окончанием с дополнительным этапом достройки длительностью 5 минут при 72°C.

Продукт этого этапа связывания (SEQ ID NO:11) очищали посредством электрофореза в агарозном геле и гель-экстракции и лигировали по тупым концам в клонирующий вектор рJET1.2 с получением рJET1.2::4НВТ-АСХ4. Затем полинуклеотид, содержащий связанные гены 4НВТ и АСХ4 субклонировали в рЕТ20b(+), получая рЕТ20b(+):4НВТ-АСХ4. Затем плазмиду рЕТ20b(+):4НВТ-АСХ4 линейаризовывали посредством рестрикционного расщепления по участкам рестрикции NheI и XhoI.

Для следующего этапа конструирования плазмиды pET20b(+):4HBT-ACX4-AcsA у гена, кодирующего аминокислотную последовательность AcsA, оптимизировали кодоны для экспрессии в *E. coli*, и его синтезировали в фирме Biomatik с добавлением на 3'-конце участка рестрикции XhoI и короткой последовательности на 5'-конце. Эта последовательность содержала участок рестрикции NheI, участок связывания рибосомы и спейсерную последовательность, заканчивающуюся тринуклеотидом цитозин-аденин-тимин, который вместе со старт-кодоном AcsA кодируют участок рестрикции NdeI.

Синтезированный полинуклеотид AcsA с оптимизированными кодонами (SEQ ID NO:12) встраивали в клонирующую плазмиду pBMH::AcsA и ген AcsA вместе с его 5' участком связывания рибосомы субклонировали в линейизованный вектор pET20b(+):4HBT-ACX4, между участками рестрикции NheI и XhoI, получая плазмиду pET20b(+):4HBT-ACX4-AcsA (фиг. 8). Затем эту плазмиду трансформировали в BL21 (DE3) pLysS *E. coli*, получая BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):4HBT-ACX4-AcsA. Последовательность между и включающая участки рестрикции NdeI и XhoI в плазмиде pET20b(+):4HBT-ACX4-AcsA, приведена в SEQ ID NO:13.

Для конструирования штамма для экспрессии только гена AcsA, ген AcsA отдельно субклонировали из клонирующего вектора pBMH::AcsA и в плазмиду pET20b(+), между участками рестрикции NdeI и XhoI, получая pET20b(+):AcsA. Затем плазмиду pET20b(+):AcsA трансформировали в BL21 (DE3) pLysS *E. coli*, получая BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):AcsA.

Коэкспрессию 4HBT, ACX4 и AcsA в BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):4HBT-ACX4-AcsA подтверждали посредством инкубации культуры (100 мл) BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):4HBT-ACX4-AcsA в среде MSX, дополненной рибофлавином (1 мг.л^{-1}) при двух различных тестовых температурах, 37°C и 28°C . Культуры выращивали до $\text{OD}_{600} 0,5$ и экспрессию индуцировали добавлением IPTG ($0,4 \text{ mM}$). Непосредственно перед индукцией экспрессии отбирали образцы, а также через 1 час, 3 часа, 5 часов и 20 часов после индукции. Также культивировали контрольные штаммы BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):ACX4, как получали в примере 2, и BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):AcsA в тех же условиях. Образцы, полученные при коэкспрессии 4HBT, ACX4 и AcsA in BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):4HBT-ACX4-AcsA, а также образцы, полученные при экспрессии только ACX4 в BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):ACX4 и AcsA в BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):AcsA анализировали посредством электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE).

Анализ посредством SDS-PAGE (фиг. 9) продемонстрировал, что когда экспрессию через 5 часов после индукции проводили при 37°C , детектировали высокие уровни растворимой 4HBT (нижняя полоса слева) и хорошие уровни ACX4 (верхняя полоса слева) с очень небольшим детектируемым количеством нерастворимого белка, при этом детектировали высокие уровни нерастворимой AcsA (верхняя полоса справа) с отсутствием белок AcsA, видимого в растворимых фракциях. Дорожка 1) пустой вектор отрицательного контроля pET20b(+). 2) Белок лестничного маркера Spectra BR. 3) Экспрессия pET20b(+):4HBT-ACX4-AcsA 0 часов, растворим. 3) 3 часа, растворим. 4) 5 часов, растворим. 5) 0 часов, нерастворим, 6) экспрессия pET20b(+):AcsA 5 часов, растворим. 7) pET20b(+):ACX4, растворим. 8) pET20b(+):4HBT, растворим. 9) pET20b(+):4HBT-ACX4-AcsA 0 часов, нерастворим. 10) pET20b(+):4HBT-ACX4-AcsA 3 часа, нерастворим. 11) pET20b(+):4HBT-ACX4-AcsA 5 часов, нерастворим. 12) pET20b(+):AcsA 5 часов, нерастворим.

Для тестирования способности BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):4HBT-ACX4-AcsA преобразовывать изомасляную кислоту в метакриловую кислоту, предварительную культуру MSX (20 мл), дополненную карбенициллином и хлорамфениколом, из одной колонии BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):4HBT-ACX4-AcsA инокулировали на чашку с LB агарозой, дополненной глюкозой, карбенициллином и хлорамфениколом, и инкубировали при 37°C с перемешиванием при 200 об./мин в течение 16 часов. Клетки собирали посредством центрифугирования при $5000 \times g$ в течение 15 минут при 4°C , и клетки ресуспендировали в среде MSX (100 мл), дополненной карбенициллином, хлорамфениколом и рибофлавином, в 250 мл встряхиваемой колбе и эту культуру инкубировали при 37°C с перемешиванием при 200 об./мин. Коэкспрессию генов индуцировали добавлением IPTG ($0,4 \text{ mM}$) при $\text{OD}_{600} 0,5$. Культуру инкубировали в течение дополнительного 1 часа с последующим добавлением изобутирата калия ($\text{pH } 7,0$) из концентрированного маточного раствора с концентрацией 500 mM до конечной концентрации 5 mM в средах для культивирования. Образцы получали непосредственно после добавления изомасляной кислоты (образец на 0 часе), а затем через 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 8 часов и 19,5 часов после этого.

Образцы, полученные в течение всего периода биотрансформации изомасляной кислоты в метакриловую кислоту, центрифугировали в центрифуге Eppendorf miniSpin F-45-12-11 в течение 5 минут при 6000 об./мин . Супернатанты фильтровали через $0,2 \text{ мкм}$ 4 мм фильтры Sartorius RC, а затем подкисляли до $\text{pH } 2,5$ посредством 5 M HCl . Подкисленный супернатант инъецировали в колонку C_{18} Agilent Zorbax Eclipse XDB ($4,6 \text{ мм} \times 150 \text{ мм}$). ВЭЖХ проводили при $0,4 \text{ мл.мин}^{-1}$ и метакриловую кислоту отделяли от изомасляной кислоты посредством изократической элюции 14% ацетонитрилом в KH_2PO_4 , который доводили до $\text{pH } 2,5$ посредством HCl . Колонку между запусками промывали посредством увеличения скорости потока до 1 мл.мин^{-1} и концентрации ацетонитрила до 75% в течение 15 минут с последующим возвращением условий к скорости потока $0,4 \text{ мл.мин}^{-1}$ и 14% ацетонитрилу для следующего образца.

Колонку перед инъекцией следующего образца оставляли для уравнивания на 20 минут.

Также обрабатывали и анализировали три отрицательных контроля. Первым контролем являлся штамм отрицательного контроля, BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+), который не содержал оперон коэкспрессии 4HBT-ACX4-AcsA, и его культивировали без добавления изомасляной кислоты в среду после добавления IPTG в среды для культивирования. Вторым использованным контролем являлся тот же штамм, что и штамм, используемый в первом контроле, но к нему через 1 час после добавления в среды для культивирования IPTG добавляли изомасляную кислоту (5 мМ). Третьим использованным контролем являлся тот же BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):4HBT-ACX4-AcsA, как использовали для основной культуры для биотрансформации, но в среды для культивирования после индукции коэкспрессии 4HBT, ACX4 и AcsA не добавляли изомасляной кислоты.

Обобщение результатов ВЭЖХ, приведенных на фиг. 10, которые представляют собой результаты для образцов, полученных через 20,5 часов после индукции из всех четырех тестируемых культур (время биотрансформации 19,5 часов). Фиг. 10С представляет собой стандарт изомасляной кислоты (5 мМ), а фиг. 10Е представляет собой стандарт изомасляной кислоты (5 мМ), смешанный со стандартом метакриловой кислоты (200 мкМ). На фигурах 10А, 10В и 10D представлено, что ни в одном из контролей метакриловой кислоты не продуцировалось, а на фиг. 10F представлено, что метакриловая кислота в течение биотрансформации действительно продуцировалась.

На фиг. 11 обобщены результаты для продукции метакриловой кислоты с течением времени, а также роста BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):4HBT-ACX4-AcsA в течение биотрансформации, где конечная концентрация требуемого продукта метакриловой кислоты составляла приблизительно 0,25 мМ.

В этом примере продемонстрирован способ преобразования в цельных клетках изомасляной кислоты в качестве сырья в метакриловую кислоту на промышленно применимых уровнях посредством коэкспрессии *in vitro* 4HBT, ACX4 и AcsA в рекомбинантных *E. coli*.

1.6. Пример 4. Получение метакриловой кислоты из глюкозы.

Ранее показано, что комплекс дегидрогеназы кетокислот с разветвленной цепью KT2440 *Pseudomonas putida* катализирует окислительное декарбоксилирование 2-кетоизовалериановой кислоты в изобутирил-CoA в рекомбинантном метаболическом пути получения изомасляной кислоты в *E. coli* (Zhang, K., Xiong, M. and Woodruff, A. P. 2012, Cells and methods for producing isobutyric acid, международный патент с номером WO 2012/109534 A2). Гены, кодирующие альфа-субъединицу дегидрогеназы кетокислот с разветвленной цепью (bkdA1), бета-субъединицу дегидрогеназы кетокислот с разветвленной цепью (bkdA2), компонент липоамидацилтрансферазы (bkdB) и компонент липоамиддегидрогеназы (lpdV) комплекса дегидрогеназы кетокислот с разветвленной цепью, в геномной ДНК KT2440 *Pseudomonas putida* (номер доступа Genbank AE015451.1) сгруппированы рядом друг с другом и все находятся под контролем одного промотора.

Полную последовательность дикого типа, кодирующую гены bkdA1, bkdA2, bkdV и lpdV, как она представлена в геномной ДНК KT2440 *Pseudomonas putida* между нуклеотидами 4992042 и 4996988, синтезировали в фирме Biomatik в виде одного полинуклеотида, ppBCKD (SEQ ID NO:14). Полинуклеотид ppBCKD содержал участок рестрикции XhoI на 3'-конце, и короткую последовательность на 5'-конце, непосредственно перед старт-кодоном гена bkdA1. Эта добавленная на 5'-конце последовательность содержала участок рестрикции XbaI, спейсерную последовательность, участок рестрикции NheI, участок связывания рибосомы и вторую спейсерную последовательность. Участок XbaI включен для обеспечения вставки полинуклеотида ppBCKD в плазмиду pET20b(+) для конструирования of pET20b(+):ppBCKD, способной к экспрессии всех четырех генов дегидрогеназы кетокислот с разветвленной цепью KT2550 *Pseudomonas putida*. Первую спейсерную последовательность включали для сохранения в плазмиде pET20b(+):ppBCKD между промотором T7 и участком связывания рибосомы того же количества пар нуклеотидов, которое существует в плазмиде pET20b(+), за исключением шести нуклеотидов, кодирующих участок NheI непосредственно перед участком связывания рибосомы, спейсерная последовательность идентична последовательности между участком XbaI и участком связывания рибосомы в плазмиде pET20b(+). Участок рестрикции NheI включали для обеспечения вставки полинуклеотида ppBCKD в плазмиду pET20b(+):4HBT-ACX4 для конструирования плазмиды pET20b(+):4HBT-ACX4-ppBCKD. Участок связывания рибосомы и спейсерная последовательность идентичны участку связывания рибосомы и спейсерной последовательности, используемым непосредственно перед геном bkdA1, когда гены BCKD экспрессировали для получения изомасляной кислоты, которое описано ранее (Zhang, K., Xiong, M. and Woodruff, A. P. 2012, Cells and methods for producing isobutyric acid, международный патент с номером WO 2012/109534 A2).

Один полинуклеотид, содержащий четыре гена дегидрогеназы кетокислот с разветвленной цепью KT2440 *Pseudomonas putida* встраивали в плазмиду pBSK (pBSK::ppBCKD). Четыре гена субклонировали из плазмиды pBSK::ppBCKD и в плазмиду pET20b(+):4HBT-ACX4 из примера 2 между участками рестрикции NheI и XhoI с получением pET20b(+):4HBT-ACX4-ppBCKD (фиг. 12). В SEQ ID NO:15 представлена последовательность между участками рестрикции NdeI и XhoI в плазмиде pET20b(+):4HBT-ACX4-ppBCKD. Плазмиду pET20b(+):4HBT-ACX4-ppBCKD трансформировали в BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с получением BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):4HBT-ACX4-ppBCKD. Подобным образом, че-

тыре гена также субклонировали в плазмиду pET20b(+) между участками рестрикции NheI и XhoI, получая pET20b(+):ppBCKD, и эту плазмиду трансформировали в BL21 (DE3) pLysS E. coli с получением BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):ppBCKD. Этот последний штамм использовали для помощи в идентификации полос на геле SDS-PAGE, соответствующих генам bkdA1, bkdA2, bkdB и lpdV при исследованиях экспрессии (не показано).

Предварительную культуру MSX (10 мл), дополненную карбенициллином и хлорамфениколом, инокулировали BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):4HBT-ACX4-ppBCKD из одной колонии на чашку с LB агарозой, дополненной глюкозой, карбенициллином и хлорамфениколом. Культуры инкубировали при 37°C с перемешиванием при 250 об./мин в течение 16 часов. Клетки собирали посредством центрифугирования при 5000×g в течение 15 минут при 4°C, а затем ресуспендировали в свежей среде MSX (100 мл), дополненной рибофлавином, а также карбенициллином и хлорамфениколом, в 500 мл встряхиваемой колбе. Свежие культуры инкубировали при 37°C с перемешиванием при 250 об./мин и в каждой культуре при OD₆₀₀ 0,5 индуцировали экспрессию посредством добавления IPTG (0,4 мМ). Культуры инкубировали в течение дополнительных 17 часов с последующим отбором образцов для анализа посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ВЭЖХ-ОФ). Для культуры отрицательного контроля BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+) проводили повторное культивирование.

Образцы центрифугировали в центрифуге Eppendorf miniSpin F-45-12-11 в течение 5 минут при 6000 об./мин. Супернатанты фильтровали через 0,2-микронные 4-мм фильтры Sartorius RC, а затем подкисляли до pH 2,5 посредством 5M HCl. Подкисленный супернатант инъецировали в колонку C₁₈ Agilent Zorbax Eclipse XDB (4,6 мм × 250 мм). ВЭЖХ проводили при 1 мл·мин⁻¹ и анализируемые вещества элюировали посредством изократической элюции с 14% ацетонитрилом в 50 мМ K₂HPO₄, который доводили до pH 2,5 посредством HCl. Колонку между запусками промывали посредством увеличения концентрации ацетонитрила до 75% в течение 15 минут с последующим возвратом до 14% ацетонитрила в течение 20 мин этапа повторного уравнивания.

Стандарты метакриловой кислоты (0,2 мМ), изомасляной кислоты (5 мМ) и 2-кетонизовалериановой кислоты (5 мМ) элюировали на 3,6 минуте, 8,3 минуте и 8,6 минуте, и с площади пиков 5980 мЕОП.мин, 330 мЕОП.мин и 1580 мЕОП.мин, соответственно. Анализ ВЭЖХ смеси 2-кетонизовалериановой кислоты (5 мМ), изомасляной кислоты (5 мМ) и метакриловой кислоты (200 мкМ) представлен на фиг. 13.

Анализ ВЭЖХ образца, полученного из культуры отрицательного контроля BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+), приведенный на фигуре 14, продемонстрировал отсутствие пиков в области, где ожидали появление метакриловой кислоты, в то время как анализ образца, полученного из культуры BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):4HBT-ACX4-ppBCKD продемонстрировал пик на 8,6 минуте с площадью пика 0,88 ЕОП.мин, соответствующей концентрации метакриловой кислоты 0,11 мМ (фиг. 15).

Для подтверждения того, что пик действительно представлял метакриловую кислоту, в образец дополнительно добавляли 0,24 мМ метакриловую кислоту из 10 мМ исходного раствора, и этот дополненный образец также анализировали посредством ВЭЖХ, представленной на фиг. 16. На 8,5 минуте наблюдали один пик с площадью 2,7 ЕОП.мин, соответствующий концентрации метакриловой кислоты 0,34 мМ, подтверждающий, что штамм BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):4HBT-ACX4-ppBCKD продуцирует метакриловую кислоту непосредственно из глюкозы.

Для определения того, могут ли поддерживающие культуры с 2-кетонизовалериановой кислотой увеличивать продукцию метакриловой кислоты снова получали две предварительные культуры MSX (10 мл), дополненных карбенициллином и хлорамфениколом, инокулируя одну BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+):4HBT-ACX4-ppBCKD, а другую BL21 (DE3) pLysS E. coli с pET20b(+), как описано ранее. Предварительные культуры инкубировали при 37°C с перемешиванием при 250 об./мин в течение 16 часов с последующим осаждением и ресуспендированием клеток в свежей среде MSX (100 мл), дополненной рибофлавином, хлорамфениколом и карбенициллином, в 500 мл встряхиваемой колбе. В каждой культуре при OD₆₀₀ 0,5 индуцировали экспрессию посредством добавления IPTG (0,4 мМ), и культуры инкубировали в течение дополнительных 3 часов с последующим добавлением 2-кетонизовалерата (pH 7,0) до конечной концентрации 5 мМ в каждой культуре. Культуры инкубировали в течение дополнительных 14 часов. Отбирали образцы культур и анализировали посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием изократической элюции, как описано для культур, которые не дополняли 2-кетонизовалериановой кислотой.

Анализ ВЭЖХ образца, взятого через 14 часов после добавления 2-кетонизовалерата в культуру отрицательного контроля BL21 (DE3) pLysS E. coli с пустым pET20b(+), представленный на фиг. 17, продемонстрировал отсутствие пиков, в области, где, как правило, наблюдают метакриловую кислоту, как и ожидалось. Однако он продемонстрировал определенное фоновое расходование 2-кетонизовалериановой кислоты (фиг. 6) с площадью пика этой 2-кетонизовалериановой кислоты в этой культуре 3353 мЕОП.мин, что соответствует 2,8 мМ 2-кетонизовалериановой кислоте, остающейся в культуре, в отличие от исходных 5 мМ.

При анализе образца, взятого через 14 часов после добавления 2-кетонизовалерата в культуру, экспрессирующую гены для преобразования 2-кетонизовалериановой кислоты в метакриловую кислоту,

культуру BL21 (DE3) pLysS *E. coli* с pET20b(+):4HBT-ACX4-ppBCKD, в результате ВЭЖХ наблюдали пик на 8,4 мин с площадью пика 1890 мЕОП.мин (фиг. 18), что указывает на продукцию метакриловой кислоты в концентрации 0,24 мМ. В этом образце 2-кетоиизовалериановой кислоты не детектировали, что указывает на то, что она полностью расходовалась при преобразовании 2-кетоиизовалериановой кислоты в метакриловую кислоту.

В образец добавляли дополнительную 0,24 мМ метакриловую кислоту и анализ дополненного образца (фиг. 19) продемонстрировал пик с площадью пика 3,4 ЕОП.мин, соответствующие концентрации метакриловой кислоте 0,44 мМ, таким образом исходный пик метакриловой кислоты являлся подлинным.

В этом примере, дегидрогеназу кетокислот с разветвленной цепью, а именно BCKD KT2440 *Pseudomonas putida*, коэкспрессировали с ацил-КоА-оксидазой, а именно ACX4 *Arabidopsis thaliana*, и ферментом тиоэстеразой, а именно 4HBT штамма SU вида *Arthrobacter*, в клеточной системе. Он демонстрирует, что продукция метакриловой кислоты из ключевого сырья, такого как глюкоза, которая является легкодоступной из биомассы, с использованием рекомбинантной *E. coli* является возможной и, кроме того, что продукцию указанной метакриловой кислоты можно увеличить посредством поддерживающей среды для выращивания с 2-кетоиизовалериановой кислотой.

1.7. Пример 5. Продукция бутилметакрилата из 2-кетоиизовалерата в цельных клетках посредством рекомбинантной *Escherichia coli*.

У гена ACX4 *A. thaliana* оптимизировали кодоны для *E. coli*, его синтезировали и клонировали в вектор pET16b (Sse). Ген расщепляли NheI/Sse8387I и лигировали в pET16b (Sse), расщепленную XbaI/Sse8387I. Полученную плазмиду, pMMA121 (см. фиг. 20), вносили в *E. coli* BL21(DE3) и рекомбинантную *E. coli* (BL21(DE3)/pMMA121) культивировали следующим образом:

BL21(DE3)/pET16b (контрольный вектор) или BL21(DE3)/pMMA121 инокулировали в среду LB, дополненную ампициллином (0,1 мг/мл), и выращивали в течение ночи в тестовой пробирке при 37°C. Аликвоту ночной культуры переносили в 100 мл той же среды в колбе и перемешивали при 37°C в течение 2-3 часов. В колбу добавляли IPTG (конечная концентрация 1 мМ) и культуру инкубировали с перемешиванием при 20°C в течение ночи.

Клетки собирали посредством центрифугирования и суспендировали в 0,1М натрий-фосфатном буфере (pH7,0), затем разрушали посредством обработки ультразвуком. Разрушенные клетки *E. coli* центрифугировали с получением фракций супернатанта и осадка, и контрольный вектор и клетки, содержащие pMMA121 анализировали на активность АСО (ацил-КоА-оксидазы) (см. фиг. 21) и экспрессию белка ACX4 посредством SDS-PAGE (см. фиг. 22). На фиг. 21 представлено наличие в буфере только IBA-КоА, присутствие IBA-КоА и небольшого количества КоА в образце, содержащем клетки, несущие только неизмененную плазмиду pET16b, и присутствие МАА-КоА, намного меньшего количества IBA-КоА и неизвестного соединения в образце, содержащем клетки, несущие плазмиду pMMA121. Таким образом, во фракции супернатанта BL21/pMMA121 детектировали высокую активность АСО, на что указывает продукция метакрилил-КоА, что демонстрирует, что белок 40 кДа, детектированный посредством SDS-PAGE на фиг. 22, представляет собой белок ACX4. На SDS-PAGE продемонстрировано: дорожка 1 - BL21/pET16b (вектор) SF (растворимая фракция); дорожка 2 - BL21/pMMA121 SF; дорожка 3 - BL21/pET16b IF (нерастворимая фракция); дорожка 4 - BL21/pMMA121 IF; и дорожка 5 маркер молекулярной массы. Полосу приблизительно 40 кДа, (выделенная черными рамками) наблюдали только в дорожках с BL21/pMMA121, но не в дорожках с BL21/pET16b (вектор).

Ген комплекса BCKAD клонировали из штамма PA01 *Pseudomonas aeruginosa*, как указано ниже. Фрагмент ДНК, содержащий целый генный оперон, кодирующий ген комплекса BCKAD, получали способом ПЦР с праймерами BCKAD.F и BCKAD.R (табл. в 1.1.3) с использованием в качестве матрицы геномной ДНК. Полученный фрагмент расщепляли рестрикционными ферментами BspHI и Sse8387I и встраивали в вектор pET16b(Sse) между NcoI/Sse8387I (участок BamE pET16b был конвертирован в участок Sse8387I). Полученную плазмиду обозначили pWA008 (см. фиг. 23).

Плазмиду для экспрессии ААТ яблока и ACX4 *A. thaliana* конструировали, как указано ниже. Фрагменты ДНК, содержащие гены ААТ или ACX4, амплифицировали способом ПЦР с праймерами ААТ.F и ААТ.R или ACX4.F и ACX4.R (табл. в 1.1.3) с использованием в качестве матрицы плазмиды, содержащих оптимизированные кодоны генов ААТ или pMMA121, соответственно. Вектор pET(Sse) расщепляли рестрикционными ферментами NcoI и Sse8387I и объединяли с фрагментом ДНК, содержащим ген ААТ с использованием набора In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio). Полученную плазмиду, pAAT212, расщепляли рестрикционным ферментом SpeI и объединяли с фрагментом ДНК, содержащим ген ACX4 с использованием набора In-Fusion HD Cloning Kit. Полученная плазида, pMMA133, содержала гены ААТ и ACX4 под контролем промотора Т7 (см. фиг. 23).

Плазмиду для экспрессии BCKAD, ААТ и ACX4 конструировали, как указано ниже. Плазмиду pMMA133 расщепляли рестрикционными ферментами SpeI и Sse8387I, и получали линейизованный фрагмент ДНК. Плазмиду pWA008 расщепляли рестрикционными ферментами XbaI и Sse8387I и выделяли фрагмент 5,0 т.п.н., содержащий ген комплекса BCKAD. Оба фрагмента лигировали с использованием набора для лигирования ДНК "Mighty Mix" (производимого Takara Bio Inc.). Полученную плазмиду

pMMA134 (см. фиг. 23) вводили в *E. coli* BL21(DE3) для экспериментов по продукции бутилметакрилата.

E. coli BL21(DE3)/pMMA134 культивировали по существу таким же способом, как описано выше в отношении экспрессии ACX4. Клетки собирали посредством центрифугирования, промывали 0,1 М натрий-фосфатным буфером (pH 7,0) и суспендировали в с получением клеточной суспензии. С использованием клеточной суспензии в каждой пробирке получали приблизительно 1 мл реакционного раствора покоящихся клеток, который содержал 40 мМ 2-кетонизовалерат (2-оксонизовалерат), 60 мМ бутанол, 0,05 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,0) и клетки ($OD_{650}=12,5$). Реакции проводили при 30°C, 180 об./мин в течение периодов от 3 до 44 часов, и в пробирки добавляли 1 мл ацетонитрила и хорошо перемешивали для остановки реакции. После фильтрации с использованием шприцевого фильтра DISMIC/диаметр 0,45 микрон (производимого ADVANTEC) проводили анализ посредством ВЭЖХ на колонке ODS. Условия ВЭЖХ являлись следующими: устройство: Waters 2695, колонка: CAPCELL PAK C₁₈ UG120, вн. диаметр 2,0 мм × 250 мм, подвижная фаза: 0,1% фосфорная кислота/65% метанол, скорость потока: 0,25 мл/мин, время запуска: 12 минут, температура колонки: 35°C и детекция: УФ 210 нм. На фиг. 24 представлена зависимость концентрации следующих химических веществ от времени ферментации: ■ - 2-кетонизовалерат (2-OIV); ▲ - изомасляная кислота (IBA); ♦ - бутилметакрилат (BMA); и ×, метакриловая кислота (MAA). По мере уменьшения концентрации сырья 2-кетонизовалерата (2-оксонизовалерат), продукция промежуточного соединения в пути изомасляной кислоты возрастает, как и продукция конечного сложноэфирного продукта бутилметакрилата.

Этот пример демонстрирует возможность продукции *in vivo* производных метакриловой кислоты, сложного эфира метакрилата бутилметакрилата, из биохимического промежуточного соединения 2-кетонизовалерат (2-оксонизовалерата), которое получают непосредственно из глюкозы, и реагента бутанола, который представляет собой стандартное промышленное сырье. Продукция бутилметакрилата продемонстрирована на промышленно применимых уровнях на основе культивирования рекомбинантных клеток *E. coli*, экспрессирующих оперон BSKAD для преобразования 2-кетонизовалерата в изобутирил-КоА, оксидазу ACX4 для преобразования изобутирил-КоА в метакрилил-КоА и ААТ для преобразования метакрилил-КоА в бутилметакрилат посредством реакции с бутанолом.

Следует обратить внимание на все бумаги и документы, поданные одновременно или ранее настоящего описания в отношении настоящей заявки и которые открыты для открытого доступа вместе с этим описанием, и содержание всех таких бумаг и документов включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Все свойства, описанные в настоящем описании (включая любое из сопровождающих формулы изобретения, реферата и фигур) и/или все этапы любого способа или процесса, описанного таким образом, можно комбинировать в любой комбинации, за исключением комбинаций, где по меньшей мере некоторые из таких свойств и/или этапов являются взаимоисключающими.

Каждое свойство, описанное в настоящей заявке (включая любое из сопровождающих формулы изобретения, реферата и фигур) можно заменять альтернативными свойствами, служащими той же, эквивалентной или подобной цели, если явно не указано иначе. Таким образом, если явно не указано иначе, каждое описанное свойство представляет собой только один из примеров общего ряда эквивалентных или сходных свойств.

Изобретение не ограничено подробным описанием указанных выше вариантов осуществления. Изобретение включает любое новое свойство, или любую новую комбинацию свойств, описанных в настоящем описании (включая любое из сопровождающих формулы изобретения, реферата и фигур), или любой новый этап или любую новую комбинацию этапов из любого способа или процесса, описанных таким образом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения метакриловой кислоты или сложных эфиров метакриловой кислоты, включающий следующие этапы:

(а) биологическое преобразование изобутирил-КоА в метакрилил-КоА под действием ацил-КоА-оксидазы и

(b) преобразование метакрилил-КоА в метакриловую кислоту или сложные эфиры метакриловой кислоты.

2. Способ по п.1, где этап (b) можно проводить биологически или химически.

3. Способ по любому из пп.1 или 2, где сложные эфиры метакриловой кислоты представляют собой сложные C₁-C₂₀-алкиловые эфиры, наиболее предпочтительно сложные C₁-C₁₂-алкиловые эфиры, особенно сложные C₁-C₄-алкиловые эфиры или сложные C₄-C₁₂-алкиловые эфиры.

4. Способ по п.3, где сложные эфиры метакриловой кислоты представляют собой бутилметакрилаты, например n-бутилметакрилат.

5. Способ по п.3 или 4, где сложные эфиры метакриловой кислоты получают биологически под действием трансферазы.

6. Способ по п.5, где трансфераза представляет собой алкогольацилтрансферазу, соответственно, с номером группы EC 2.3.1.84.

7. Способ по п.6, где алкогольацилтрансферазу получают из фруктового источника, такого как яблоко, дыни или томата.

8. Способ по любому из пп.6 или 7, где алкогольацилтрансфераза действует в присутствии спирта, например C_1 - C_{12} -спирта, такого как C_1 - C_4 -спирт или C_4 - C_{12} -спирт, с получением соответствующего сложного алкилового эфира.

9. Способ по любому из пп.1 или 2, где способ включает дополнительный этап (с) преобразования метакриловой кислоты, получаемой на этапе (b), в сложный эфир метакриловой кислоты.

10. Способ по п.9, где этап (с) можно проводить биологически или химически.

11. Способ по п.9 или 10, где этап (с) проводят биологически под действием эстеразы или гидролазы.

12. Способ по любому из пп.1-11, где ацил-КоА-оксидаза имеет номер группы EC 1.3.3.6.

13. Способ по п.12, где ацил-КоА-оксидаза выбрана из любого из следующих ферментов: ACX4 *Arabidopsis thaliana*, оксидаза ацил-КоА с короткой цепью *Arthrobacter nicotianae*, пероксисомальная ацил-КоА-оксидаза *Vigna radiate*, ацил-КоА-оксидаза вида *Candida* и ацил-КоА-оксидаза *Candida tropicalis*.

14. Способ по любому из пп.12 или 13, где ацил-КоА-оксидаза представляет собой ACX4 *Arabidopsis thaliana*.

15. Способ по любому из пп.1, 2 или 9-14, где метакрилил-КоА преобразуют в метакриловую кислоту под действием тиоэстеразы, трансферазы, синтетазы и/или фосфотрансацилазы и киназы жирных кислот с короткой цепью.

16. Способ по п.15, где метакрилил-КоА преобразуют в метакриловую кислоту под действием тиоэстеразы.

17. Способ по п.15 или 16, где метакрилил-КоА преобразуют в метакриловую кислоту под действием тиоэстеразы, и тиоэстераза представляет собой ацил-КоА-тиоэстеразу 4HBT штамма SU вида *Arthrobacter*.

18. Рекомбинантный микроорганизм, адаптированный для проведения следующих этапов:

(a) биологическое преобразование изобутирил-КоА в метакрилил-КоА посредством экспрессии ацил-КоА-оксидазы и

(b) биологическое преобразование метакрилил-КоА в метакриловую кислоту;

где рекомбинантный микроорганизм представляет собой *Escherichia coli* и микроорганизм экспрессирует следующие ферменты:

(a) (i) ацил-КоА-оксидазу; и одну или несколько из:

(b) (i) ацил-КоА-тиоэстеразы;

(ii) КоА-трансферазы;

(iii) кислота-тиол-синтетазы;

(iv) фосфотрансацилазы и киназы жирных кислот с короткой цепью;

(v) алкогольацилтрансферазы.

19. Микроорганизм, генетически модифицированный одной или несколькими гетерологичными нуклеиновыми кислотами, для проведения следующих этапов:

(a) биологическое преобразование изобутирил-КоА в метакрилил-КоА посредством экспрессии ацил-КоА-оксидазы и

(b) биологическое преобразование метакрилил-КоА в метакриловую кислоту, где микроорганизм экспрессирует следующие ферменты:

(a) (i) ацил-КоА-оксидазу; и одну или несколько из:

(b) (i) ацил-КоА-тиоэстеразы;

(ii) КоА-трансферазы;

(iii) кислота-тиол-синтетазы;

(iv) фосфотрансацилазы и киназы жирных кислот с короткой цепью;

(v) алкогольацилтрансферазы.

20. Микроорганизм, адаптированный для проведения следующих этапов:

(a) биологическое преобразование изобутирил-КоА в метакрилил-КоА посредством экспрессии ацил-КоА-оксидазы и

(b) биологическое преобразование метакрилил-КоА в метакриловую кислоту или сложные эфиры метакриловой кислоты, где микроорганизм экспрессирует следующие ферменты:

(a) (i) ацил-КоА-оксидазу; и одну или несколько из:

(b) (i) ацил-КоА-тиоэстеразы;

(ii) КоА-трансферазы;

(iii) кислота-тиол-синтетазы;

(iv) фосфотрансацилазы и киназы жирных кислот с короткой цепью;

(v) алкогольацилтрансферазы.

21. Микроорганизм по п.20, где сложные эфиры метакриловой кислоты представляют собой C_1 - C_{20} -алкиловые эфиры, наиболее предпочтительно сложные C_1 - C_{12} -алкиловые эфиры, особенно сложные C_1 - C_4 -алкиловые эфиры или сложные C_4 - C_{12} -алкиловые эфиры.

22. Микроорганизм по любому из пп.18-21, где микроорганизм экспрессирует следующие ферменты:
- (a) ацил-КоА-оксидазу, такую как ACX4; и
 - (b) ацил-КоА-тиоэстеразу, такую как 4HBT.
23. Микроорганизм по любому из пп.18-22, где микроорганизм экспрессирует следующие ферменты:
- (a) ACX4, соответственно, *Arabidopsis thaliana* и
 - (b) 4HBT, соответственно, вида *Arthrobacter*.
24. Микроорганизм, адаптированный для проведения следующих этапов:
- (a) биологическое преобразование изобутирил-КоА в метакрилил-КоА посредством экспрессии ацил-КоА-оксидазы и
 - (b) биологическое преобразование метакрилил-КоА в сложный C₁-C₂₀-эфир метакриловой кислоты, соответственно сложный C₁-C₁₂-эфир метакриловой кислоты, такой как сложный C₁-C₄- или C₄-C₁₂-эфир метакриловой кислоты, посредством экспрессии алкогольацилтрансферазы, где микроорганизм адаптирован для экспрессии следующих ферментов:
 - (a) ацил-КоА-оксидазы и
 - (b) алкогольацилтрансферазы.
25. Микроорганизм по п.24, где микроорганизм представляет собой *Escherichia coli*.
26. Микроорганизм по п.24 или 25, где ацил-КоА-оксидаза представляет собой ACX4 *Arabidopsis thaliana*.
27. Микроорганизм по любому из пп.24-26, где алкогольацилтрансферазу получают из фруктового источника, такого как яблоко, дыни или томата.
28. Микроорганизм по любому из пп.24-27, где микроорганизм представляет собой рекомбинантный микроорганизм.
29. Микроорганизм по любому из пп.18-28, где микроорганизм является генетически модифицированным для увеличения продукции метакриловой кислоты или сложных эфиров метакриловой кислоты.
30. Микроорганизм по пп.18-29, где микроорганизм может являться генетически модифицированным посредством модификаций, которые уменьшают или устраняют активность фермента, который катализирует синтез соединений, отличных от метакриловой кислоты или сложных эфиров метакриловой кислоты посредством конкуренции за те же субстраты и/или промежуточные соединения, посредством модификаций, которые уменьшают или устраняют активность фермента, который обеспечивает метаболизм метакриловой кислоты или метаболизм промежуточного соединения при продукции метакриловой кислоты, и/или посредством модификаций, которые уменьшают или устраняют активность белков, участвующих в других клеточных функциях, которые удаляют промежуточные соединения при продукции метакриловой кислоты или сложных эфиров метакриловой кислоты.
31. Способ получения метакриловой кислоты или сложных эфиров метакриловой кислоты, включающий культивирование одного или нескольких микроорганизмов по любому из пп.18-30 в ферментационной среде.
32. Способ по п.31, где сложные эфиры метакриловой кислоты представляют собой сложные C₁-C₂₀-алкиловые эфиры, наиболее предпочтительно сложные C₁-C₁₂-алкиловые эфиры, особенно сложные C₁-C₄-алкиловые эфиры или сложные C₄-C₁₂-алкиловые эфиры.
33. Ферментационная среда, содержащая один или несколько микроорганизмов по любому из пп.18-30.
34. Ферментационная среда по п.33, где среда дополнительно содержит метакриловую кислоту или сложные эфиры метакриловой кислоты.
35. Ферментационная среда по п.34, где сложные эфиры метакриловой кислоты представляют собой сложные C₁-C₂₀-алкиловые эфиры, наиболее предпочтительно сложные C₁-C₁₂-алкиловые эфиры, особенно сложные C₁-C₄-алкиловые эфиры или сложные C₄-C₁₂-алкиловые эфиры.
36. Способ получения полимеров метакриловой кислоты, включающий этапы:
- (i) получения метакриловой кислоты по любому из пп.1-17;
 - (ii) полимеризации метакриловой кислоты, полученной в (i), с получением их полимеров.
37. Способ получения сополимеров метакриловой кислоты, включающий этапы:
- (i) получения метакриловой кислоты по любому из пп.1-17;
 - (ii) полимеризации метакриловой кислоты, полученной в (i), с использованием одного или более сомономеров, с получением их сополимеров.
38. Способ получения полимеров сложных эфиров метакриловой кислоты, включающий этапы:
- (i) получения сложных эфиров метакриловой кислоты по любому из пп.1-17;
 - (ii) полимеризации сложных эфиров метакриловой кислоты, полученных в (i), с получением их полимеров.
39. Способ получения сополимеров сложных эфиров метакриловой кислоты, включающий этапы:
- (i) получения сложных эфиров метакриловой кислоты по любому из пп.1-17;
 - (ii) полимеризации сложных эфиров метакриловой кислоты, полученных в (i), с использованием одного или более сомономеров, с получением их сополимеров.

40. Способ по п.36 или 37, где способ включает дополнительный этап этерификации метакриловой кислоты, полученной в (i), для получения сложного эфира метакриловой кислоты с последующим этапом (ii) полимеризации эфира метакриловой кислоты для получения его полимеров.

41. Способ по п.40, где полимеризацию эфира метакриловой кислоты осуществляют с одним или несколькими сомономерами для получения их сополимеров.

42. Способ по п.38 или 39, где сложные эфиры метакриловой кислоты представляют собой сложные C_1 - C_{20} -алкиловые эфиры, наиболее предпочтительно сложные C_1 - C_{12} -алкиловые эфиры, особенно сложные C_1 - C_4 -алкиловые эфиры или сложные C_4 - C_{12} -алкиловые эфиры.

43. Способ получения метакриловой кислоты, включающий следующие этапы:

(a) биологическое преобразование изобутирил-КоА в метакрилил-КоА под действием ацил-КоА-оксидазы и

(b) биологическое преобразование метакрилил-КоА в метакриловую кислоту под действием тиюэстеразы, соответственно 4-гидроксibenzoил-КоА-тиуюэстеразы (4НВТ).

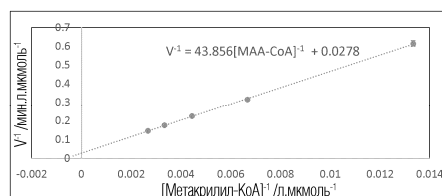
44. Микроорганизм, адаптированный для проведения следующих этапов:

(a) биологическое преобразование изобутирил-КоА в метакрилил-КоА под действием ацил-КоА-оксидазы и

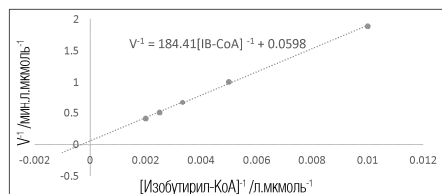
(b) биологическое преобразование метакрилил-КоА в метакриловую кислоту под действием тиюэстеразы, соответственно 4-гидроксibenzoил-КоА-тиуюэстеразы (4НВТ), где микроорганизм адаптирован для экспрессии следующих ферментов:

(a) ацил-КоА-оксидазы и

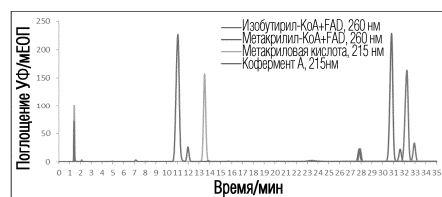
(b) 4-гидроксibenzoил-КоА-тиуюэстеразы (4НВТ).



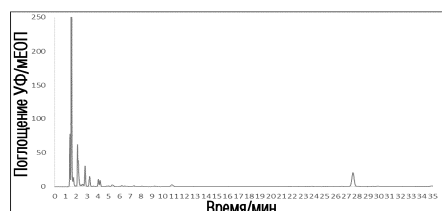
Фиг. 1



Фиг. 2

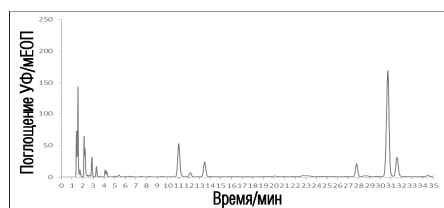


Фиг. 3

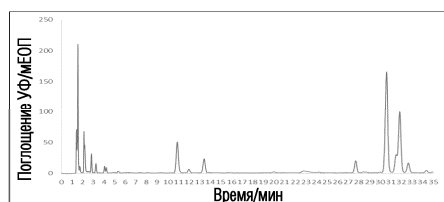


Фиг. 4

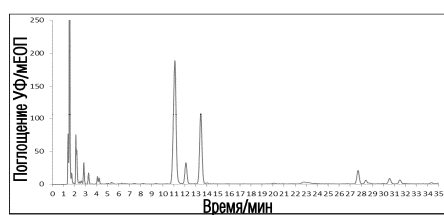
043272



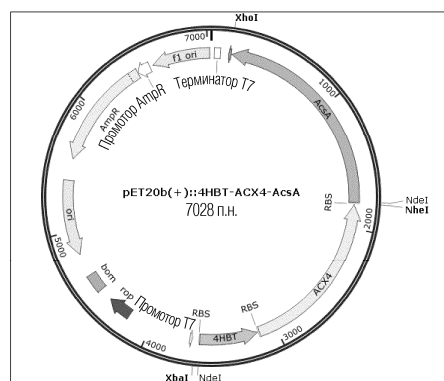
Фиг. 5



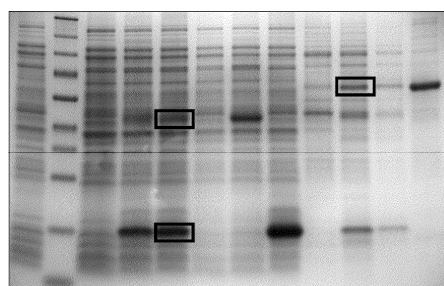
Фиг. 6



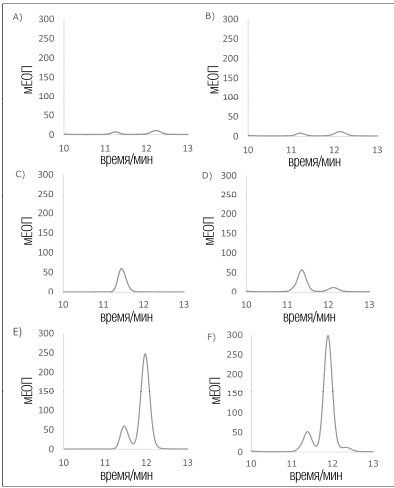
Фиг. 7



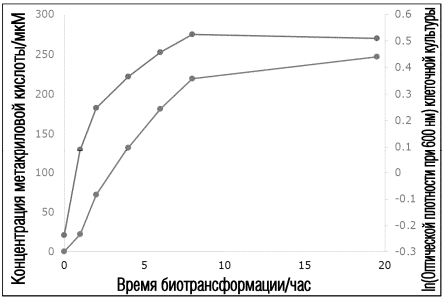
Фиг. 8



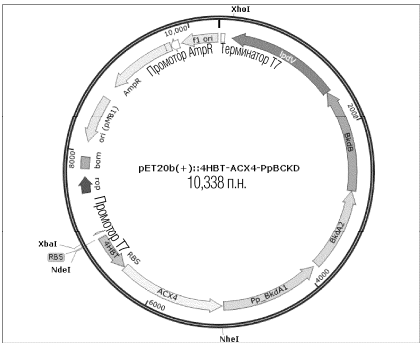
Фиг. 9



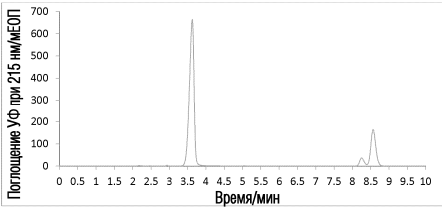
Фиг. 10



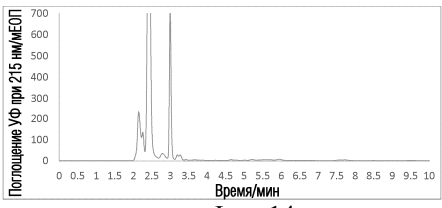
Фиг. 11



Фиг. 12

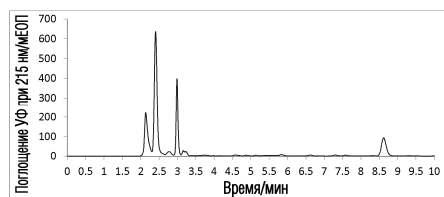


Фиг. 13

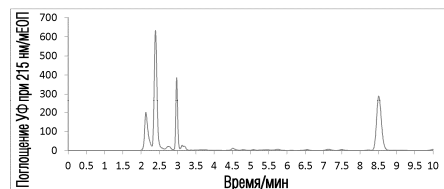


Фиг. 14

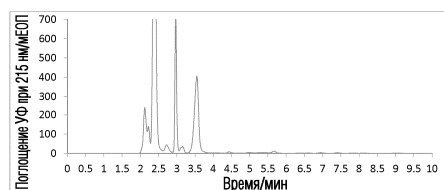
043272



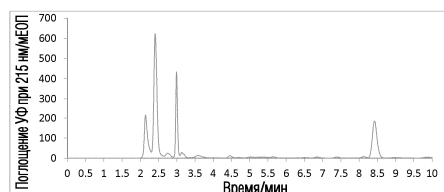
Фиг. 15



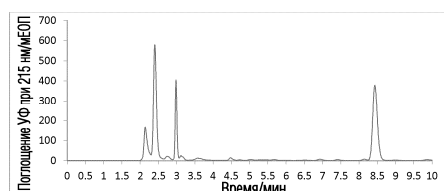
Фиг. 16



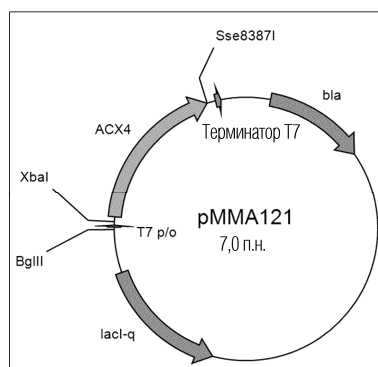
Фиг. 17



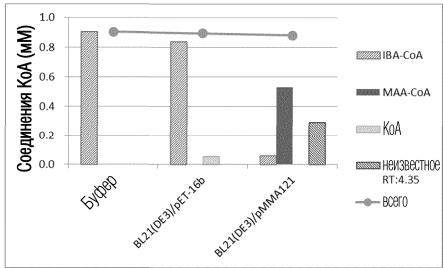
Фиг. 18



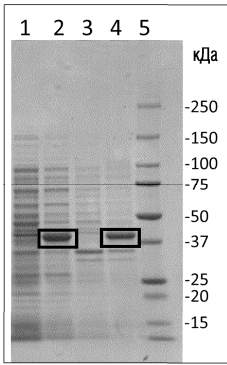
Фиг. 19



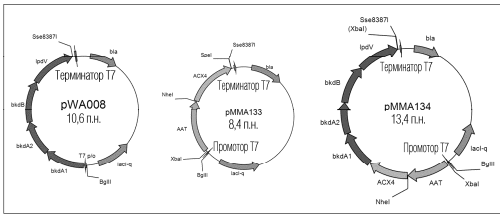
Фиг. 20



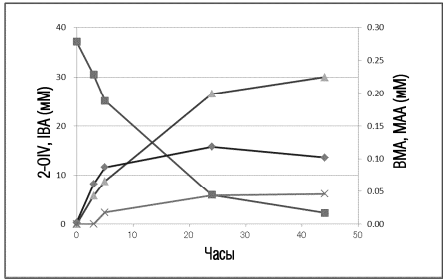
ФИГ. 21



Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24