

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 844**

51 Int. Cl.:

C12P 5/02 (2006.01)

C12P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2009** **E 09799636 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014** **EP 2516656**

54 Título: **Procedimiento para la producción de isoprenol a partir de mevalonato, empleando una difosfomevalonato descarboxilasa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.07.2014

73 Titular/es:

GLOBAL BIOENERGIES (50.0%)
5 Rue Henri Desbruères
91030 Evry Cedex, FR y
SCIENTIST OF FORTUNE S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

MARLIERE, PHILIPPE;
ANISSIMOVA, MARIA;
CHAYOT, ROMAIN y
DEL COURT, MARC

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 478 844 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de isoprenol a partir de mevalonato, empleando una difosfomevalonato descarboxilasa.

5 La presente invención se refiere a un método para la producción de isoprenol utilizando mevalonato como sustrato y convirtiéndolo enzimáticamente en isoprenol mediante una etapa de descarboxilación. La presente invención también se refiere al uso de una enzima que tiene la actividad de una difosfomevalonato descarboxilasa (EC 4.1.1.33) para la producción de isoprenol a partir de mevalonato.

10 Además de ello, la presente invención se refiere a un método para la producción de isopreno, comprendiendo el método para la producción de isoprenol utilizando mevalonato como sustrato y convirtiéndolo enzimáticamente en isoprenol mediante una etapa de descarboxilación y que comprende, además, la etapa de convertir el isoprenol producido en isopreno. La presente invención también se refiere a un método para la producción de alcohol isoamílico que comprende el método para la producción de isoprenol utilizando mevalonato como sustrato y convirtiéndolo enzimáticamente en isoprenol mediante una etapa de descarboxilación en isoprenol y que comprende, además, la etapa de convertir el isoprenol producido en alcohol isoamílico.

Isoprenol responde a la fórmula $C_5H_{10}O$. Se puede utilizar para producir prenol, que se utiliza en perfumes o como un bloque de construcción en la industria farmacéutica. Es producido por la condensación química de isobuteno y formaldehído, que conduce a isoprenol que se isomeriza adicionalmente para formar prenol.

20 La ruta que se utiliza actualmente para producir isoprenol implica la vía del mevalonato: se produce mevalonato y, a continuación, se difosforila, después se descarboxila-deshidrata en pirofosfato de isoprenilo, y finalmente se desfosforila dos veces para dar isoprenol (solicitud de patente de EE.UU. 20080092829).

25 El documento de NABETA, K. ET AL.: "Metabolism of *RS*-Mevalonic Acid-6,6,6- 2H_3 by *in Vitro* Callus Culture of *Perilla* sp." (AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 49, nº 10, 1985, páginas 3039-3040) describe un procedimiento para la preparación de isoprenol, que comprende la conversión de mevalonato en isoprenol, empleando un cultivo del tejido del callo derivado de *Perilla* sp.

30 Isoprenol se puede convertir en isopreno que es un compuesto clave para la industria del neumático, y también tiene muchas aplicaciones en los adhesivos. Se produce químicamente utilizando varias rutas:

- Destilación extractiva del petróleo (corte C5)
- Deshidrogenación de iso-amileno
- Doble deshidrogenación de isopentano
- 35 - Reacción de isobuteno y formaldehído
- Reacción de acetona y acetileno
- Dimerización de propileno

40 El documento WO 2009/076676 informa de una vía metabólica para formar isopreno. La vía se basa en la desfosforilación-deshidratación de productos intermedios aguas abajo en la vía del mevalonato, es decir, pirofosfato de isoprenilo o pirofosfato de prenilo. Este proceso tiene el inconveniente de requerir recorrer toda la vía del mevalonato: doble fosforilación de mevalonato, seguida de una descarboxilación-deshidratación en pirofosfato de isoprenilo, adicionalmente isomerizado para formar pirofosfato de prenilo y, finalmente, doble desfosforilación/deshidratación para dar isopreno.

45 Alcohol isoamílico es un producto químico muy importante, comúnmente utilizado como disolventes para grasas, aceites, resinas y alcaloides. Existe una demanda de alcohol isoamílico en la industria de la perfumería, por ejemplo en la fabricación de salicilato de isoamilo utilizado en jabón y fragancias cosméticas. También se utiliza en la fabricación de ácido fosfórico. Además de ello, se utiliza en la síntesis de piretroides. Los procesos comerciales para la producción de alcohol isoamílico incluyen el fraccionamiento de aceites de fusel, la cloración de alcanos con subsiguiente hidrólisis para producir una mezcla de isómeros y un oxo-proceso a baja presión o la hidroformilación de n-butenos, seguida de hidrogenación del iso-valeraldehído resultante.

50 Existe una necesidad de proporcionar métodos no contaminantes, económicos y sencillos para producir los compuestos mencionados anteriormente. Esta necesidad se satisface mediante la materia objeto tal como se expone en las reivindicaciones.

55 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir isoprenol a partir de mevalonato. En particular, la presente invención se refiere a un método para producir isoprenol a partir de mevalonato, que se caracteriza por una conversión de mevalonato con una enzima que tiene la actividad de una difosfomevalonato descarboxilasa (EC 4.1.1.33). Por lo tanto, el método comprende la descarboxilación catalizada enzimáticamente de mevalonato. El término "descarboxilación", cuando se utiliza en el contexto de la presente invención, se refiere a una descarboxilación deshidratante.

65 El término "mevalonato" comprende ácido mevalónico, así como el anión de ácido mevalónico, que es la forma predominante en medios biológicos. Ácido mevalónico es un precursor en la vía biosintética, conocida como la vía del mevalonato, que produce terpenos y esteroides. Mevalonato es el precursor principal de pirofosfato de isoprenilo,

que es a su vez la base para todos los terpenoides. La fórmula estructural de ácido mevalónico se muestra en la Figura 1.

5 En el contexto de la presente invención, el término isoprenol comprende compuestos que responden a la fórmula $C_5H_{10}O$. El nombre IUPAC de isoprenol es 3-metilbut-3-en-1-ol. Sinónimos de isoprenol son, por ejemplo, 2-metil-1-buten-4-ol, 3-buten-1-ol-3-metilo, alcohol 3-isopentenílico, 3-metil-3-buten-1-ol, isobutenilcarbinol, alcohol isopropeniletílico y metalil carbinol.

10 La expresión "enzima que tiene la actividad de una difosfomevalonato descarboxilasa (EC 4.1.1.33)" en el contexto de la presente invención se refiere a una enzima que es capaz de descarboxilar mevalonato, en particular de acuerdo con el esquema de reacción dado en la Figura 2. La reacción catalizada es una deshidratación y descarboxilación simultáneas. Esta actividad enzimática se puede medir como se describe en los Ejemplos 1 ó 7 adjuntos.

15 La enzima que tiene la actividad de una difosfomevalonato descarboxilasa (EC 4.1.1.33) es una enzima que se clasifica como una difosfomevalonato descarboxilasa o es una enzima que se deriva de una enzima de este tipo y que tiene la capacidad de descarboxilar mevalonato a fin de producir isoprenol. Difosfomevalonato descarboxilasa está clasificada con el número EC 4.1.1.33. Una difosfomevalonato descarboxilasa es capaz de catalizar la descarboxilación de mevalonato difosfato. En esta reacción, ATP y 5-difosfomevalonato se convierten en ADP, fosfato, pirofosfato de isoprenilo y CO_2 . La reacción catalizada por una difosfomevalonato descarboxilasa se muestra en la Figura 2. La actividad de una difosfomevalonato descarboxilasa se puede medir de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, p. ej., en Reardon et al. (Biochemistry 26 (1987), 4717-4722). Preferiblemente, la actividad se mide como se describe en el Ejemplo 1 ó 7 en el que se utiliza difosfomevalonato en lugar de mevalonato.

20 Se ha informado que, al menos en algunos casos, la reacción es dependiente de cationes divalentes (véase, p. ej., Krepiy et al., Protein Science 13 (2004), 1875-1881; Michihara et al, Biol. Pharm. Bull. 25 (2002), 302-306).

25 Difosfomevalonato descarboxilasa es una enzima que, en su función natural, es parte de la vía del mevalonato para la síntesis de isoprenoides en bacterias y de la vía de biosíntesis de esterol en eucariotas. Se ha identificado y aislado a partir de diversos organismos tales como animales, hongos, levaduras y bacterias. También se expresa en determinadas plantas.

30 La estructura tridimensional de varias difosfomevalonato descarboxilasas ya ha sido determinada (véase, p. ej., Byres et al. (J. Mol. Biol. 371 (2007), 540-553); Bonanno et al. (Proc. Natl Acad. Sci. USA 98 (2001), 12896-12901); Voynova et al., Archives of Biochemistry and Biophysics 480 (2008), 58-67)) y está disponible un considerable conocimiento acerca de su sitio activo, residuos aminoácidos cruciales para la reacción catalítica y la reacción enzimática real (véase, p. ej., Byres et al. (J. Mol. Biol. 371 (2007), 540-553); Bonanno et al. (Proc. Natl Acad. Sci. USA 98 (2001), 12896-12901)). En la mayoría de los casos la enzima está compuesta de aproximadamente 300 a 35 400 aminoácidos y utiliza ATP como co-sustrato, el cual se convierte durante la reacción de descarboxilación en ADP y fosfato inorgánico.

Difosfomevalonato descarboxilasas se han descrito para diversos organismos y también secuencias de aminoácidos y nucleótidos que las codifican están disponibles para numerosas fuentes.

40 En principio, en el contexto de la presente invención se puede utilizar cualquier difosfomevalonato descarboxilasa, en particular de organismos procariotas o eucariotas. Difosfomevalonato descarboxilasas eucariotas se describen, por ejemplo, para animales, tales como *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Sus scrofa*, *D. melanogaster*, *C. elegans* y *Trypanosoma brucei*, para plantas tales como *Arabidopsis thaliana*, *Ginkgo biloba*, *Oryza sativa*, *Pisum sativum*, para levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*. También se han descrito numerosas difosfomevalonato descarboxilasas, p. ej., para *Helicobacter*, *Staphylococcus aureus*, 45 *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus reuteri*, por nombrar sólo algunos. La Tabla 1 proporciona una lista de secuencias de difosfomevalonato descarboxilasas de diferentes organismos que indican los números de acceso de los que se pueden recuperar de las respectivas bases de datos.

Tabla 1

Organismo	Número de Acceso Genbank
Bombyx mori	A5A7A2
Cepa YJM7 de Saccharomyces cerevisiae	A6ZSB7
Solanum lycopersicum	A8WBX7
Hevea brasiliensis	A9ZN03
Nicotiana langsdorfii x Nicotiana glauca	B3F8H5
Saccharomyces cerevisiae (cepa RM11-1a)	B3LPK0
Phaeodactylum tricomutum CCAP 1055	B7S422
Candida dubliniensis	B9W6G7
Picchia pastoris	C4QX63
Ashbya gossypii	Q751D8
Bos taurus	Q0P570
Danio rerio	Q5U403
Dictyostelium discoideum	Q54YQ9
Homo sapiens	P53602
Mus musculus	Q89JFS
Rattus norvegicus	Q62967
Schizosaccharomyces pombe	O13963
Saccharomyces cerevisiae	P32377
Arnebia euchroma	Q09RL4
Aspergillus oryzae	Q2UGF4
Mus musculus	Q3UYC1
Gingko biloba	Q5UCT8
Rattus norvegicus	Q642E5
Oryza sativa subsp. japonica	Q6ETS8
Arabidopsis thaliana	Q8LB37
Encephalitozoon cuniculi	Q8SRR7
Hevea brasiliensis	Q944G0

- 5 Ejemplos de difosfomevalonato descarboxilasas de diferentes organismos se dan en SEQ ID NO: 1 a 19. En una forma de realización preferida de la presente invención, la difosfomevalonato descarboxilasa es una enzima que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 19 o una secuencia que es al menos n% idéntica a cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 19 y que tiene la actividad de una difosfomevalonato descarboxilasa, siendo n un número entero entre 10 y 100, preferiblemente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99.

10 Preferiblemente, el grado de identidad se determina comparando la secuencia respectiva con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NOs. arriba mencionados. Cuando las secuencias que se comparan no tienen la misma longitud, el grado de identidad se refiere preferiblemente al porcentaje de residuos aminoácidos en la secuencia más corta que son idénticos a los residuos aminoácidos en la secuencia más larga o al porcentaje de residuos aminoácidos en la secuencia más larga que son idénticos a los residuos aminoácidos en la secuencia más corta. El grado de identidad de la secuencia puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica utilizando preferiblemente algoritmos informáticos adecuados tal como CLUSTAL.

15 Cuando se utiliza el método de análisis Clustal para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 80% idéntica a una secuencia de referencia, se pueden utilizar ajustes por defecto o los ajustes son preferiblemente como sigue: Matriz: blosum 30; Abrir penalización para el hueco: 10,0; Extender penalización para el hueco: 0,05; Retrasar divergente: 40; Distancia de separación del hueco: 8 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos. Para las comparaciones de secuencias de nucleótidos, Extender penalización para el hueco se ajusta preferiblemente a 5,0.

20 Preferiblemente, el grado de identidad se calcula en la longitud completa de la secuencia. Además de ello, si el término "homología" se utiliza en el contexto de la presente invención, el término significa preferiblemente "identidad de la secuencia".

25 En una forma de realización preferida, la difosfomevalonato descarboxilasa empleada en el método de acuerdo con la invención es una difosfomevalonato descarboxilasa de Picrophilus torridus o un organismo que está evolutivamente estrechamente relacionado con Picrophilus torridus. En una forma de realización preferida adicional, la difosfomevalonato descarboxilasa se origina a partir de un organismo del género Picrophilus, Thermoplasma o Ferroplasma, más preferiblemente de la especie Picrophilus torridus, Picrophilus oshimae, Thermoplasma volcanicum, Thermoplasma acidophilum, Ferroplasma acidarmanus o Ferroplasma cupricumulans.

35

En una forma de realización particularmente preferida, la difosfomevalonato descarboxilasa empleada en el método de acuerdo con la invención es una difosfomevalonato descarboxilasa que comprende la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 6, 16, 17, 18 ó 19, o que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos n% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 6, 16, 17, 18 ó 19 y que tiene la actividad de una difosfomevalonato descarboxilasa, siendo n un número entero entre 10 y 100, preferiblemente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99. La enzima que muestra la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NOs: 6 y 16 procede de *Picrophilus torridus*. Tal como se muestra en los Ejemplos, esta enzima es particularmente eficaz en la catálisis de la descarboxilación del mevalonato a isoprenol. Difosfomevalonato descarboxilasas preferidas, a emplear en el método de acuerdo con la presente invención, son difosfomevalonato descarboxilasas que proceden de organismos que están filogenéticamente estrechamente relacionados con *Picrophilus torridus* tales como otras bacterias del género *Picrophilus* tal como *Picrophilus oshimae*, bacterias del género *Ferroplasma*, p. ej., *Ferroplasma acidarmanus* (SEQ ID NO: 19), o del género *Thermoplasma* tal como *Thermoplasma acidophilum* (SEQ ID NO: 18) y *Thermoplasma volcanium* (SEQ ID NO: 17). La difosfomevalonato descarboxilasa de *Thermoplasma acidophilum* (número AC Q9HIN1) muestra una homología del 38% con la SEQ ID NO: 6 y la de *Thermoplasma volcanium* (número AC Q97BY2) muestra una homología de aproximadamente 42% con la SEQ ID NO: 6.

En otra forma de realización particularmente preferida, la difosfomevalonato descarboxilasa empleada en el método de acuerdo con la invención es una difosfomevalonato descarboxilasa que es codificada por una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 20 ó 21, o por una secuencia de nucleótidos que es al menos n% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 20 ó 21 y que codifica una enzima que tiene la actividad de una difosfomevalonato descarboxilasa, siendo n un número entero entre 10 y 100, preferiblemente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99. La SEQ ID NO: 20 es la secuencia de nucleótidos nativa que codifica la MDP descarboxilasa procedente de *P. torridus* que incluye una etiqueta His en el extremo N-terminal. La SEQ ID NO: 21 es una secuencia optimizado en el codón que codifica la MDP descarboxilasa procedente de *P. torridus* que incluyendo una etiqueta His en el extremo N-terminal.

La difosfomevalonato descarboxilasa empleada en el procedimiento de acuerdo con la invención puede ser una difosfomevalonato descarboxilasa de origen natural, o puede ser una difosfomevalonato descarboxilasa que se deriva de una difosfomevalonato descarboxilasa de origen natural (p. ej., mediante la introducción de mutaciones u otras alteraciones que, p. ej., alteran o mejoran la actividad enzimática, la estabilidad, etc.

La expresión "difosfomevalonato descarboxilasa" o "una proteína/enzima que tiene la actividad de una difosfomevalonato descarboxilasa" en el contexto de la presente solicitud también abarca enzimas que se derivan de una difosfomevalonato descarboxilasa, que son capaces de catalizar la descarboxilación de mevalonato, pero que sólo tienen una baja afinidad por su sustrato natural, mevalonato difosfato, o que ya no aceptan su sustrato natural, mevalonato difosfato. Una modificación de este tipo del sustrato preferido de una difosfomevalonato descarboxilasa, permite mejorar la conversión de mevalonato en isoprenol y reducir la producción del sub-producto que posiblemente aparece, pirofosfato de isoprenilo. Métodos para modificar y/o mejorar las actividades enzimáticas deseadas de proteínas son bien conocidos por la persona experta en la técnica, e incluyen, p. ej., mutagénesis al azar o mutagénesis dirigida al sitio y la subsiguiente selección de enzimas que tienen las propiedades o los enfoques de la denominada "evolución dirigida" deseados, barajado de ADN o evolución in vivo

Por ejemplo, para la ingeniería genética en células procarióticas, una molécula de ácido nucleico que codifica una difosfomevalonato descarboxilasa se puede introducir en plásmidos que permiten la mutagénesis o modificación de la secuencia por recombinación de secuencias de ADN. Los métodos estándares (véase Sambrook y Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU.) permiten realizar intercambios de bases o añadir secuencias naturales o sintéticas. Fragmentos de ADN se pueden conectar entre sí mediante la aplicación de adaptadores y enlazadores a los fragmentos. Además de ello, se pueden utilizar medidas de ingeniería que proporcionan sitios de restricción adecuados o que eliminan el ADN o sitios de restricción excedentes. En aquellos casos, en los que son posibles inserciones, deleciones o sustituciones, se puede utilizar la mutagénesis *in vitro*, una "reparación de cebadores", restricción o ligamiento. En general, como métodos de análisis se lleva a cabo un análisis de la secuencia, análisis de restricción y otros métodos de bioquímica y biología molecular. Las variantes de difosfomevalonato descarboxilasa se ensayan después en cuanto a su actividad enzimática y, en particular, a su capacidad para preferir mevalonato como sustrato en lugar de mevalonato difosfato.

Métodos de este tipo para identificar variantes con propiedades enzimáticas mejoradas en cuanto a la producción de isoprenol también pueden llevarse a cabo en presencia de un cofactor que permite una complementación estérica y/o electrónica en el sitio catalítico de la enzima debido al hecho de que el sustrato mevalonato es más corto que el sustrato natural mevalonato difosfato de difosfomevalonato descarboxilasa. Ejemplos de un cofactor de este tipo serían fosfono-fosfato o fosfonamido-fosfato (véase la Figura 7) u ortofosfato.

La versión modificada de la difosfomevalonato descarboxilasa que acepta o prefiere mevalonato como sustrato, pero que tiene una baja afinidad por su producto natural mevalonato difosfato como un sustrato o que no acepta su producto natural mevalonato difosfato, como un sustrato puede derivarse de una difosfomevalonato descarboxilasa de origen natural, o de una difosfomevalonato descarboxilasa ya modificada, optimizada o sintetizada sintéticamente.

Sorprendentemente, se ha encontrado que difosfomevalonato descarboxilasa no sólo es capaz de catalizar la descarboxilación de mevalonato difosfato, sino también puede aceptar mevalonato como sustrato y puede descarboxilarlo, a pesar de la ausencia del grupo difosfato. Esto es particularmente sorprendente, ya que Jabalquinto y Cardemil (Biochim. Biophys. Acta 996 (1989), 257-259), quienes investigaron los requisitos de unión del sustrato difosfomevalonato descarboxilasa vinculantes, señalaron la importancia del resto difosfórico de mevalonato difosfato en la unión de este sustrato al sitio catalítico de la enzima (véase la página 259). En este contexto, es importante señalar las diferencias sustanciales entre mevalonato y difosfomevalonato. Mevalonato sólo tiene un peso molecular de aproximadamente 148 Da, mientras que difosfomevalonato tiene un peso molecular de 308 Da y los grupos fosfato portan tres cargas adicionales.

La difosfomevalonato descarboxilasa empleada en el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede ser una versión natural de la proteína o una proteína sintética, así como una proteína que ha sido sintetizada o producida químicamente en un sistema biológico o por procesos recombinantes. La difosfomevalonato descarboxilasa, también puede estar modificada químicamente, por ejemplo con el fin de mejorar su estabilidad, resistencia, p. ej. a la temperatura, para facilitar su purificación o su inmovilización sobre un soporte. La difosfomevalonato descarboxilasa se puede utilizar en forma aislada, forma purificada, en forma inmovilizada, como un extracto crudo o parcialmente purificado obtenido a partir de células que sintetizan la enzima, tal como una enzima químicamente sintetizada, como una enzima producida de forma recombinante, en forma de un organismo/microorganismos productores de las mismas, etc.

El método de acuerdo con la presente invención se puede llevar a cabo in vitro o in vivo. Una reacción in vitro se entiende que es una reacción en la que no se emplean células, es decir, una reacción acelular.

Para llevar a cabo el procedimiento in vitro los sustratos para la reacción y la enzima se incuban en condiciones (tampón, temperatura, co-sustratos, cofactores, etc.) que permiten que la enzima sea activa y se produzca la conversión enzimática. Se deja que la reacción prosiga durante un tiempo suficiente para producir isoprenol. La producción de isoprenol se puede medir por métodos conocidos en la técnica tales como cromatografía, p. ej., cromatografía en capa fina o cromatografía líquida o gaseosa, posiblemente vinculadas a la detección de espectrometría de masas.

La enzima puede estar en cualquier forma adecuada que permita que se lleve a cabo la reacción enzimática. Puede estar purificada o parcialmente purificada o en forma de extractos celulares crudos o extractos parcialmente purificados. También es posible que la enzima esté inmovilizada sobre un soporte adecuado.

Si se requiere, se añaden también un co-sustrato, un co-factor o iones. Se describe, por ejemplo, que algunas enzimas difosfomevalonato descarboxilasa utilizan ATP como un co-sustrato que se convierte en ADP y fosfato inorgánico durante la reacción de descarboxilación. Por lo tanto, en una realización preferida, el ATP se añade a la reacción cuando se lleva a cabo el método de acuerdo con la invención. Sin embargo, en lugar de ATP se puede añadir a la mezcla de reacción cualquier otro rNTP (ribonucleósido trifosfato) o dNTP (desoxirribonucleósido trifosfato) adecuado o cualquier mezcla de éstos. También es posible la adición de pirofosfato u otro polifosfato o una molécula que contiene un grupo fosfoanhídrido (POP). Además de ello, se puede añadir cualquier mezcla de cualquiera de los compuestos antes mencionados. Además de ello, se describe para algunas enzimas difosfomevalonato descarboxilasa que requieren cationes divalentes. Por lo tanto, en una realización preferida, y si es necesario, se añade una cantidad adecuada de un catión divalente adecuado a la reacción cuando se lleva a cabo el método de acuerdo con la invención. El catión divalente es preferiblemente Mg^{2+} , Mn^{2+} o Co^{2+} , pero es posible utilizar también otros cationes divalentes tales como Ca^{2+} . Por supuesto, la naturaleza del catión divalente depende de la necesidad de la enzima difosfomevalonato descarboxilasa en cuestión.

Dado que el sustrato mevalonato es, en general, más corto que el sustrato natural utilizado por la enzima, mevalonato difosfato utilizado por difosfomevalonato descarboxilasa, puede ser ventajoso añadir a la mezcla de reacción un cofactor que permita una complementación estérica y/o electrónica en el sitio catalítico de la enzima. Ejemplos de un cofactor de este tipo de difosfomevalonato descarboxilasa, serían fosfono-fosfato o fosfonamido-fosfato (véase la Figura 7) u ortofosfato.

Para llevar a cabo el procedimiento in vivo se hace uso de un organismo/microorganismo(s) adecuado que sea/sean capaces de proporcionar el sustrato mevalonato, y una difosfomevalonato descarboxilasa. Hay dos vías alternativas que conducen a pirofosfato de isoprenilo. Una de ellas es la vía del mevalonato, observada en eucariotas y algunos procariotas, especialmente en el filo firmicutes. Así, todos estos organismos producen mevalonato. La mayoría de las bacterias, incluyendo *E. coli*, utilizan la otra vía (vía DXP) y, por lo tanto, no están produciendo mevalonato. Sin embargo, este último puede ser modificado genéticamente para producir mevalonato. Por ejemplo, la implementación de la vía del mevalonato en *E. coli* ya ha sido realizada con éxito (Maury et al., FEBS Lett. 582 (2008), 4032). La sobre-expresión de sólo la parte de aguas arriba (tiolasa, HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa) en organismos que tienen o que no tienen la vía del mevalonato permite la producción de altos niveles de mevalonato.

En una realización preferida, el organismo empleado en el método de acuerdo con la invención es un organismo, preferiblemente un microorganismo, que ha sido modificado genéticamente para que contenga una molécula de ácido nucleico extraño que codifica una difosfomevalonato descarboxilasa. El término "extraña" en este contexto significa que la molécula de ácido nucleico no se produce de forma natural en dicho organismo/microorganismo. Esto

significa que no se produce en la misma estructura o en el mismo lugar en el organismo/microorganismo. En una forma de realización preferida, la molécula de ácido nucleico extraño es una molécula recombinante que comprende un promotor y una secuencia codificadora que codifica la difosfomevalonato descarboxilasa, en que el promotor que impulsa la expresión de la secuencia codificadora de conducción es heterólogo con respecto a la secuencia codificadora. Heterólogo en este contexto significa que el promotor no es el promotor que impulsa de forma natural la expresión de dicha secuencia codificadora, sino que es un promotor que impulsa de forma natural la expresión de una secuencia codificadora diferente, es decir, que se deriva de otro gen, o es un promotor sintético o un promotor quimérico. Preferiblemente, el promotor es un promotor heterólogo para el organismo/microorganismo, es decir, un promotor que no se produce de forma natural en el respectivo organismo/microorganismo. Incluso más preferiblemente, el promotor es un promotor inducible. Promotores para impulsar la expresión en diferentes tipos de organismos, en particular en microorganismos, son bien conocidos por la persona experta en la técnica.

En otra forma de realización preferida, la molécula de ácido nucleico es extraña para el organismo/microorganismo, debido a que la difosfomevalonato descarboxilasa codificada no es endógena al organismo/microorganismo, es decir, no es expresada de forma natural por el organismo/microorganismo cuando no es genéticamente modificado.

En otras palabras, la difosfomevalonato descarboxilasa codificada es heteróloga con respecto al organismo/microorganismo. La molécula de ácido nucleico extraña puede estar presente en el organismo/microorganismo en forma extracromosómica, p. ej., como un plásmido, o puede estar integrada de manera estable en el cromosoma. Se prefiere una integración estable.

En una forma de realización preferida adicional, el organismo/microorganismo se caracteriza por que la expresión/actividad de una difosfomevalonato descarboxilasa es mayor en el organismo/microorganismo genéticamente modificado con la molécula de ácido nucleico extraño en comparación con el correspondiente organismo/microorganismo no genéticamente modificado. Una expresión/actividad "elevada" significa que la expresión/actividad de la difosfomevalonato descarboxilasa en el microorganismo genéticamente modificado es al menos 10%, preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 30% o 50%, incluso más preferiblemente al menos 70% o 80% y de manera particularmente preferida al menos 90% o 100% mayor que en el correspondiente organismo/microorganismo no genéticamente modificado. En formas de realización incluso más preferidas, el aumento en la expresión/actividad puede ser al menos 150%, al menos 200% o al menos 500%.

La expresión expresión/actividad "elevada" también abarca la situación en la que el correspondiente organismo/microorganismo no genéticamente modificado no expresa una difosfomevalonato descarboxilasa, de manera que la correspondiente expresión/actividad en el organismo/microorganismo no genéticamente modificado es cero.

Métodos para medir el nivel de expresión de una proteína dada en una célula son bien conocidos por la persona experta en la técnica. En una forma de realización, la medición del nivel de expresión se realiza mediante midiendo la cantidad de la proteína correspondiente. Métodos correspondientes son bien conocidos por la persona experta en la técnica e incluyen transferencia Western, ELISA, etc. En otra forma de realización, la medición del nivel de expresión se realiza midiendo la cantidad del ARN correspondiente. Métodos correspondientes son bien conocidos por la persona experta en la técnica e incluyen, por ejemplo, transferencia Northern.

Métodos para medir la actividad enzimática de la difosfomevalonato descarboxilasa son conocidos en la técnica y ya han sido descritos anteriormente.

El término "organismo", tal como se utiliza en el contexto de la presente invención, se refiere, en general, a cualquier posible tipo de organismo, en particular organismos eucariotas, organismos bacterianos y arqueas. El término incluye animales, plantas, hongos, bacterias y arqueas. El término también incluye células aisladas o agregados de células de estos organismos tal como el tejido o callos.

En una forma de realización preferida, el organismo es un microorganismo. El término "microorganismo" en el contexto de la presente invención se refiere a células procariotas, en particular bacterias, así como a hongos tales como levaduras, y también a algas y arqueobacterias. En una forma de realización preferida, el microorganismo es una bacteria. En principio, se puede utilizar cualquier bacteria. Bacterias preferidas a emplear en el procedimiento de acuerdo con la invención son todas las cepas de producción clásicas para las que se han desarrollado herramientas de ingeniería. En una forma de realización particularmente preferida, la bacteria pertenece al género *Escherichia* o *Bacillus*, e incluso más preferida a la especie *Escherichia coli* o a la especie *Bacillus subtilis*.

En otra forma de realización preferida, el microorganismo es un hongo. Hongos preferidos a emplear en el procedimiento de acuerdo con la invención son todas las cepas de producción clásicas para las que se han desarrollado las herramientas de ingeniería. Más preferiblemente, el hongo es una levadura, preferiblemente del género *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia* o *Kluyveromyces*, e incluso más preferiblemente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* o de la especie *Kluyveromyces lactis*. Otros hongos preferidos son los del género *Trichoderma* o *Aspergillus*, más preferiblemente de la especie *Trichoderma reesei* o *Aspergillus niger*.

Todavía en otra forma de realización preferida, el microorganismo es un microorganismo fotosintéticamente activo tal como bacterias que son capaces de llevar a cabo la fotosíntesis o micro-algas.

En una forma de realización particularmente preferida, el microorganismo es un alga, más preferiblemente un alga que pertenece a la diatomeas.

Cuando el procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo in vivo o utilizando un

- organismo/microorganismo que proporciona la actividad de difosfomevalonato descarboxilasa, el organismo, preferiblemente microorganismo, se cultiva bajo condiciones de cultivo adecuadas que permitan la aparición de la reacción enzimática. Las condiciones de cultivo específicas dependen del organismo/microorganismo específico empleado, pero son bien conocidas por la persona experta en la técnica. Las condiciones de cultivo se eligen generalmente de manera que permiten la expresión de los genes que codifican las enzimas para la reacción respectiva. Diversos métodos son conocidos por la persona experta en la técnica a fin de mejorar y perfeccionar la expresión de determinados genes en determinadas etapas del cultivo, tales como la inducción de la expresión génica por inductores químicos o por un cambio de temperatura.
- En otra forma de realización preferida, el organismo empleado en el método de acuerdo con la invención es una planta. En principio, se puede utilizar cualquier planta posible, es decir, una planta monocotiledónea o una planta dicotiledónea. Es preferible utilizar una planta que se pueda cultivar en a escala agrícola significativa y que permita producir grandes cantidades de biomasa. Ejemplos son hierbas tales como *Lolium*, cereales tales como centeno, trigo, cebada, avena, mijo, maíz, otras plantas que almacenan almidón tales como patata o plantas que almacenan azúcar tales como la caña de azúcar o remolacha azucarera. También es concebible el uso de tabaco o de plantas de hortalizas tales como tomate, pimiento, pepino, berenjena, etc. Otra posibilidad es el uso de plantas oleaginosas tal como semillas de colza, aceitunas, etc. También es concebible el uso de árboles, en particular árboles de rápido crecimiento tal como el eucalipto, el álamo o el árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*).
- También se describe el uso de un organismo, preferiblemente un microorganismo, que expresa una enzima que es capaz de catalizar la descarboxilación de mevalonato, preferiblemente una enzima con la actividad de una difosfomevalonato descarboxilasa, para la producción de isoprenol por la descarboxilación de mevalonato. Es decir, también se describe el uso de un organismo/microorganismo tal como se describe en el contexto del método para la producción de isoprenol.
- Además de ello, también se describe una composición que comprende (i) mevalonato; y (ii) una enzima que es capaz de catalizar la descarboxilación de mevalonato. Para las formas de realización preferidas de la enzima se aplica lo mismo a lo ya expuesto anteriormente. De manera particularmente preferida, la composición comprende también un co-sustrato (tal como ATP), un co-factor y/o cationes divalentes (tales como Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} o Ca^{2+}).
- Además de ello, la presente invención también se refiere al uso de una difosfomevalonato descarboxilasa para la producción de isoprenol. Para las formas de realización preferidas de la enzima se aplica lo mismo a lo ya expuesto anteriormente en relación con el método de acuerdo con la invención.
- También se describe el uso de mevalonato para la producción de isoprenol, en particular, por la conversión enzimática de la mevalonato en isoprenol mediante una etapa de descarboxilación. Preferiblemente, la conversión enzimática se logra mediante una enzima como se describe anteriormente, más preferiblemente con una enzima que tiene la actividad enzimática de una difosfomevalonato descarboxilasa, y lo más preferiblemente la conversión se logra mediante el uso de un organismo tal como se describe en el contexto del método.
- Además, la presente invención también se refiere a un método para la producción de isopreno a partir de mevalonato, que comprende el método para producir isoprenol de acuerdo con la invención según se describe arriba y que comprende, además, la etapa de convertir el isoprenol producido en isopreno. La conversión de isoprenol en isopreno puede lograrse por medios y métodos conocidos por la persona experta en la técnica. En particular, la reacción respectiva es una reacción de deshidratación.
- Además de ello, la presente invención también se refiere a un método para producir alcohol isoamílico a partir de mevalonato que comprende el método para producir isoprenol de acuerdo con la invención tal como se describe arriba y que comprende, además, la etapa de convertir el isoprenol producido en alcohol isoamílico. La conversión de isoprenol en alcohol isoamílico se puede lograr por medios y métodos conocidos por la persona experta en la técnica. En particular, la reacción respectiva es una reacción de hidrogenación.
- Figura 1:** muestra la estructura química de mevalonato
- Figura 2:** muestra la reacción de difosfomevalonato descarboxilasa en el sustrato fisiológico y en el precursor mevalonato
- Figura 3:** muestra un ejemplo de rastreo de un banco de enzimas para la actividad de la mevalonato descarboxilasa tras la producción de fosfato inorgánico. La reacción de control se llevó a cabo con extracto de BL21 (DE3) de *E. coli* transformada con pET 22b que carece del gen MDP descarboxilasa.
- Figura 4:** (a) muestra los resultados de la optimización de la expresión de MDP descarboxilasa de *P. torridus*

en *E. coli*. El análisis de SDS-PAGE de muestras de proteínas obtenidas a partir de la expresión de la secuencia de ADN de MDP descarboxilasa de *P. torridus* (pistas 1 a 3) y del gen optimizado (pistas 4 a 6).

(b) muestra la actividad de la descarboxilación de mevalonato de lisado bruto de *E. coli*, obtenida a partir de la expresión de la secuencia de ADN de MDP descarboxilasa de *P. torridus* y del gen optimizado. La reacción de control se llevó a cabo con el extracto de BL21 (DE3) de *E. coli* transformado con pET 22b que carecen del gen MDP descarboxilasa. La actividad enzimática se detectó a través de la medición de la producción de fosfato inorgánico.

5

10 **Figura 5:** muestra la comparación de la actividad de la descarboxilación de mevalonato entre MDP descarboxilasas del filo *Picrophilus/Thermoplasma*. La actividad enzimática se detectó mediante la medición de la producción de fosfato inorgánico.

15 **Figura 6:** muestra la formación de producto en función de la concentración de mevalonato. La formación de producto fue seguido por el ensayo de permanganato.

Figura 7: muestra la estructura de fosfono-fosfato y fosfonamido-fosfato.

Los siguientes Ejemplos sirven para ilustrar la invención.

20 **Ejemplo 1: Rastreo de un banco de MDP descarboxilasa para la actividad de descarboxilación de mevalonato**

Se construyó un banco de 63 genes que codifican enzimas de la familia de la MDP descarboxilasa y se ensayó en cuanto a la actividad de mevalonato como sustrato.

25 *Clonación, cultivos bacterianos y expresión de proteínas*

Los genes que codifican mevalonato difosfato (MDP) descarboxilasa EC 4.1.1.33 se clonaron en el vector pET 25b (Novagen) en el caso de genes eucariotas y en pET 22b (Novagen) en el caso de genes procariotas. Se insertó un tramo de 6 codones de histidina después del codón de iniciación de metionina para proporcionar una etiqueta de afinidad para la purificación. Células competentes de BL21 (DE3) de *E. coli* (Novagen) se transformaron con estos vectores de acuerdo con el proceso de choque de calor. Las células transformadas se hicieron crecer con agitación (160 rpm) a 30°C en medio de caldo terrific (TB) que contenía sorbitol 0,5 M, betaína 5 mM, 100 µg/ml de ampicilina hasta alcanzar una DO a 600 nm comprendida entre 0,8 y 1. A continuación se añadió isopropil-B-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM y la expresión de proteínas se continuó a 20°C durante una noche (aproximadamente 16 h). Las células se recogieron por centrifugación a 4°C, 10.000 rpm durante 20 min y los sedimentos se congelaron a -80°C.

40 *Lisis celular*

Los sedimentos a partir de 12 ml de células de cultivo se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 1 ml de Tris/HCl 50 mM pH 7,4, que contenía KCl 20 mM, DTT 0,5 mM, MgCl₂ 5 mM. Se añadió un microlitro de lisonase (Novagen). Las células se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se devolvieron al hielo durante 20 minutos. La lisis celular se completó mediante tratamiento por ultrasonidos durante 15 segundos. Los extractos bacterianos se clarificaron luego mediante centrifugación a 4°C, 10.000 rpm durante 20 min.

Reacciones enzimáticas

La reacción enzimática deseada (conversión de mevalonato en isoprenol) se ensayó como sigue.

50 El medio de reacción contenía mevalonato 100 mM, ATP 40 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 20 mM, DTT 0,5 mM y preparación enzimática que varía entre 0,01 y 0,05 mg/ml de proteína. Se utilizó citrato de sodio 50 mM en el intervalo de pH de 4 a 6 y Tris-HCl 50 mM para pH 7 y 7,5. Se llevaron a cabo en paralelo ensayos de control libres de enzimas. Después de 72 h de incubación, el fosfato inorgánico se cuantificó por colorimetría de acuerdo con el método de molibdato de amonio (Gawronski JD, Benson DR, Anal. Biochem. 327 (2004) 114-118). Una muestra de 50 µl (que no contiene más de 0,5 µmol de fosfato) se mezcló con 150 µl de reactivo molibdato de amonio que contiene 50% v / v de acetona, H₂SO₄ 1,25 N, (NH₄)₅Mo₇O₂₄ 2,5 mM y luego con 10 µl de ácido cítrico 1 M. La mezcla se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de fosfomolibdato de amonio formado se midió a 355 nm y la cantidad de fosfato inorgánico se estimó utilizando una curva de calibración obtenida con fosfato de potasio.

60 Los resultados se muestran en la Figura 3.

Durante el rastreo inicial, sólo los ensayos que utilizan la cepa recombinante que expresa la construcción genética inferida de la secuencia de MDP descarboxilasa de *Picrophilus torridus* dieron lugar a un aumento reproducible en la producción de fosfato sobre el nivel de fondo.

65 **Ejemplo 2: Optimización de la expresión de MDP descarboxilasa de *P. torridus* en *E. coli* (no de acuerdo con**

la invención)

El nivel inicial de expresión de la enzima en BL21 de *E. coli* era bajo, como se juzga a partir de la débil banda visible en geles de SDS-PAGE. El Índice de Optimización de Codones (CAI – siglas en inglés) de la secuencia nativa para la expresión en *E. coli* medidos con el programa "Optimizer", disponible en <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>, basado en el método de Sharp y Li (Nucl. Acids Res. 15 (1987), 1281 -1295) dio un valor tan bajo como 0,23.

Se generó una secuencia de gen que codifica una proteína idéntica, pero que contienen codones mejor adaptados para la expresión en *E. coli*. Contaba con un CAI de 0,77.

La secuencia nativa y la secuencia optimizada se muestran en SEQ ID NO: 20 (secuencia nativa de MDP descarboxilasa de *P. torridus* (AAT43941) que incluye la etiqueta His) y SEQ ID NO: 21 (secuencia optimizada de MDP descarboxilasa de *P. torridus* (AAT43941) que incluye la etiqueta His). La secuencia optimizada se sintetizó por concatenación de oligonucleótidos y se clonó en un vector de expresión pET25b. Después de la transformación de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* y de la inducción, las proteínas se produjeron y analizaron en un gel tal como se describe de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 1. El mismo protocolo se llevó a cabo con la secuencia nativa para comparación.

Se compararon los niveles de expresión utilizando la secuencia de nucleótidos nativa o la secuencia optimizada para la expresión en *E. coli*. Los resultados en la Figura 4a demuestran que la proteína (flecha) correspondiente al gen optimizado era claramente visible en el gel en el lisado de células no-purificado (pista 4), lo que indica un aumento muy notable en la expresión.

La expresión de la proteína se mejoró de manera que el lisado bruto obtenido con la secuencia optimizada contenía una actividad enzimática más alta con mevalonato como sustrato tal como se muestra en la Figura 4b.

Ejemplo 3: Caracterización de la Reacción utilizando la MDP descarboxilasa de *P. torridus* optimizada

La enzima recombinante se purificó como sigue:

Purificación y concentración de proteínas

Los sedimentos procedentes de 150 ml de células de cultivo se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 5 ml de Na₂HPO₄ pH 8 que contenía NaCl 300 mM, MgCl₂ 5 mM y DTT 1 mM. Se añadieron veinte microlitros de lysonase (Novagen). Las células se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se devolvieron a hielo durante 20 minutos. La lisis celular se completó mediante tratamiento por ultrasonidos durante 3 x 15 segundos. Los extractos bacterianos se clarificaron luego mediante centrifugación a 4°C, 10.000 rpm durante 20 min. Los lisados bacterianos clarificados se cargaron en una columna de Ni-IDA PROTINO-1000 (Macherey-Nagel), permitiendo la adsorción de proteínas etiquetadas con 6-His. Las columnas se lavaron y las enzimas de interés se eluyeron con 4 ml de Na₂HPO₄ 50 mM pH 8 que contenía NaCl 300 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, imidazol 250 mM. Los productos eluidos se concentraron y se desalaron en una unidad de filtro Amicon Ultra-4 de 10 kDa (Millipore) y se resuspendieron en 250 µl de Tris-HCl 50 M pH 7,4 que contenía DTT 0,5 mM y MgCl₂ 5 mM. Las concentraciones de proteína se cuantificaron de acuerdo con el método de Bradford.

La pureza de las proteínas, así purificadas, se estimó como de aproximadamente 90%.

La actividad de la enzima se confirmó y se analizó adicionalmente utilizando un sustrato gama: se demostró que la tasa de conversión aumentaba con la concentración de mevalonato (Figura 6).

Ejemplo 4: Optimización de las condiciones de reacción mediante el uso de un co-factor

Se llevó a cabo la misma reacción que la descrita en el Ejemplo 1 utilizando preparaciones purificadas de MDP descarboxilasa de *P. torridus* optimizadas. En una de las muestras, el fosfono-fosfato o fosfonamido-fosfato (Figura 7) se añade como cofactor a una concentración de 100 mM.

La conversión de mevalonato se observa utilizando el ensayo colorimétrico descrito en el Ejemplo 1. Se ha encontrado que cuando está presente un cofactor, la cantidad de ATP consumida en el tiempo es notablemente mayor.

Ejemplo 5: Rastreo de un banco de homólogos de MDP descarboxilasa del filo de *P. torridus*

La secuencia de enzimas MDP descarboxilasa inferidas de los genomas de *Thermoplasma volcanium* (número de acceso Q97BY2) y *Thermoplasma acidophilum* (número de acceso Q9HIN 1) se generó como en el Ejemplo 1. Las proteínas se purificaron como se describe en el Ejemplo 3 y se sometieron a ensayo utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 1. Se observó un aumento significativo en la producción de fosfato a partir de estos viales, lo que indica que estas enzimas también eran activas hacia mevalonato. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Ejemplo 6: Método para sintetizar isoprenol a partir de glucosa

K12 de *E. coli* se transformó con un plásmido de expresión que porta los genes de tiolasa, HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa a partir de *Saccharomyces cerevisiae* con el fin de sobreproducir mevalonato.

La cepa se transforma adicionalmente con un segundo plásmido de expresión compatible portador del gen

optimizado que codifica la versión etiquetada con His de MDP descarboxilasa procedente de *Picrophilus torridus*. Las bacterias recombinantes resultantes se incuban entonces en un fermentador en un medio de nutrientes minerales que contiene glucosa, en presencia de oxígeno y bajo agitación moderada. Se mide una producción significativa de isoprenol utilizando la TLC (siglas inglesas de cromatografía en capa fina) o análisis de GC/MS como sigue:

Análisis por TLC

Para el análisis de TLC de una parte alícuota de medio de reacción se esparce sobre una placa recubierto de sílice y se cromatografía utilizando como eluyente acetato de etilo/heptano 1/1 v/v. Como patrones internos se utilizan mevalonato, isoprenol, ATP, ADP. Después del secado, las placas se pulverizan con reactivo de KMnO_4 alcalino. Se encuentra que el R_f para isoprenol es 0,57.

Análisis GC / MS

Se centrifuga una parte alícuota de 10 μl de medio de reacción y el sobrenadante se transfiere a un vial limpio para la detección de isoprenol por GC/MS. Una muestra de 1 μL se separa por GC utilizando una columna DB-5 y la presencia de isoprenol se controla mediante espectrometría de masas.

Ejemplo 7: Medición de la actividad mevalonato descarboxilasa y producción de 3-metil-buten-1-ol (isoprenol) (no de acuerdo con la invención)

El mevalonato se prepara a partir de mevanolactona (Sigma) mediante hidrólisis con NaOH de acuerdo con Campos et al. (Biochem. J. 2001, 353, 59-67).

El ensayo completo para la descarboxilación de mevalonato contiene tampón de reacción, mevalonato 100 mM, ATP 40 mM, MgCl_2 10 mM, KCl 20 mM, DTT 0,5 mM y preparación enzimática a una concentración que oscila entre 0,01 y 0,05 mg/ml de proteína. Citrato de sodio 50 mM se utiliza en el intervalo de pH de 4 a 6, y Tris-HCl 50 mM para pH 7 y 7,5. Las reacciones de control se llevan a cabo en ausencia de enzima, sustrato o cofactor.

El progreso de la producción isoprenol es seguido por el análisis de partes alícuotas tomadas a intervalos de tiempo sucesivos a partir de una mezcla de reacción incubada a 37°C mediante cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) y la determinación del producto mediante ensayo del permanganato. En paralelo, la liberación de fosfato inorgánico se cuantifica por el método de molibdato de amonio.

Ensayo de permanganato

La formación de productos que contienen dobles enlaces es seguida de oxidación con disolución de permanganato de potasio alcalino, dando como resultado un aumento de la absorbancia a 420 nm.

A una parte alícuota de la mezcla de reacción diluida con H_2O a 120 μl , se añaden 80 μl de reactivo de permanganato que contiene KMnO_4 5 mM y NaOH 50 mM. La mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante 20 min y se mide la absorbancia a 420 nm. La curva de calibración se prepara utilizando isoprenol comercial.

Cuantificación de fosfato inorgánico

La concentración de fosfato inorgánico se mide por colorimetría espectroscópica de acuerdo con el método de molibdato de amonio (Gawronski JD, Benson DR, Anal. Biochem. 327 (2004) 114-118). Una parte alícuota de 50 μl procedente del ensayo de reacción (que no contiene más de 0,5 μmol de fosfato) se mezcla con 150 μl de reactivo de molibdato de amonio, que contiene 50% en volumen de acetona, H_2SO_4 1,25 N, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 2,5 mM y luego con 10 μl de ácido cítrico 1 M. La mezcla se incuba a continuación durante 2 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de fosfomolibdato de amonio formado se midió a 355 nm y la cantidad de fosfato inorgánico se estimó utilizando una curva de calibración obtenida con fosfato de potasio.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Marliere, Philippe
 5 <120> Método para la producción de isoprenol utilizando mevalonato como un sustrato
 <130> R1062 PCT S3
 <160> 21
 10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Ala Ser Glu Lys Pro Leu Ala Ala Val Thr Cys Thr Ala Pro Val
1          5          10          15

Asn Ile Ala Val Ile Lys Tyr Trp Gly Lys Arg Asp Glu Glu Leu Val
          20          25          30

Leu Pro Ile Asn Ser Ser Leu Ser Val Thr Leu His Gln Asp Gln Leu
          35          40          45

Lys Thr Thr Thr Thr Ala Val Ile Ser Lys Asp Phe Thr Glu Asp Arg
50          55          60

Ile Trp Leu Asn Gly Arg Glu Glu Asp Val Gly Gln Pro Arg Leu Gln
65          70          75          80

Ala Cys Leu Arg Glu Ile Arg Cys Leu Ala Arg Lys Arg Arg Asn Ser
          85          90          95

Arg Asp Gly Asp Pro Leu Pro Ser Ser Leu Ser Cys Lys Val His Val
          100          105          110

Ala Ser Val Asn Asn Phe Pro Thr Ala Ala Gly Leu Ala Ser Ser Ala
          115          120          125

Ala Gly Tyr Ala Cys Leu Ala Tyr Thr Leu Ala Arg Val Tyr Gly Val
          130          135          140

Glu Ser Asp Leu Ser Glu Val Ala Arg Arg Gly Ser Gly Ser Ala Cys
145          150          155          160

Arg Ser Leu Tyr Gly Gly Phe Val Glu Trp Gln Met Gly Glu Gln Ala
          165          170          175
    
```

ES 2 478 844 T3

Asp Gly Lys Asp Ser Ile Ala Arg Gln Val Ala Pro Glu Ser His Trp
180 185 190

Pro Glu Leu Arg Val Leu Ile Leu Val Val Ser Ala Glu Lys Lys Leu
195 200 205

Thr Gly Ser Thr Val Gly Met Arg Ala Ser Val Glu Thr Ser Pro Leu
210 215 220

Leu Arg Phe Arg Ala Glu Ser Val Val Pro Ala Arg Met Ala Glu Met
225 230 235 240

Ala Arg Cys Ile Arg Glu Arg Asp Phe Pro Ser Phe Ala Gln Leu Thr
245 250 255

Met Lys Asp Ser Asn Gln Phe His Ala Thr Cys Leu Asp Thr Phe Pro
260 265 270

Pro Ile Ser Tyr Leu Asn Ala Ile Ser Trp Arg Ile Ile His Leu Val
275 280 285

His Arg Phe Asn Ala His His Gly Asp Thr Lys Val Ala Tyr Thr Phe
290 295 300

Asp Ala Gly Pro Asn Ala Val Ile Phe Thr Leu Asp Asp Thr Val Ala
305 310 315 320

Glu Phe Val Ala Ala Val Trp His Gly Phe Pro Pro Gly Ser Asn Gly
325 330 335

Asp Thr Phe Leu Lys Gly Leu Gln Val Arg Pro Ala Pro Leu Ser Ala
340 345 350

Glu Leu Gln Ala Ala Leu Ala Met Glu Pro Thr Pro Gly Gly Val Lys
355 360 365

Tyr Ile Ile Val Thr Gln Val Gly Pro Gly Pro Gln Ile Leu Asp Asp
370 375 380

Pro Cys Ala His Leu Leu Gly Pro Asp Gly Leu Pro Lys Pro Ala Ala
385 390 395 400

<210> 2
<211> 396
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*
<400> 2

ES 2 478 844 T3

Met Thr Val Tyr Thr Ala Ser Val Thr Ala Pro Val Asn Ile Ala Thr
1 5 10 15

Leu Lys Tyr Trp Gly Lys Arg Asp Thr Lys Leu Asn Leu Pro Thr Asn
20 25 30

Ser Ser Ile Ser Val Thr Leu Ser Gln Asp Asp Leu Arg Thr Leu Thr
35 40 45

Ser Ala Ala Thr Ala Pro Glu Phe Glu Arg Asp Thr Leu Trp Leu Asn
50 55 60

Gly Glu Pro His Ser Ile Asp Asn Glu Arg Thr Gln Asn Cys Leu Arg
65 70 75 80

Asp Leu Arg Gln Leu Arg Lys Glu Met Glu Ser Lys Asp Ala Ser Leu
85 90 95

Pro Thr Leu Ser Gln Trp Lys Leu His Ile Val Ser Glu Asn Asn Phe
100 105 110

Pro Thr Ala Ala Gly Leu Ala Ser Ser Ala Ala Gly Phe Ala Ala Leu
115 120 125

Val Ser Ala Ile Ala Lys Leu Tyr Gln Leu Pro Gln Ser Thr Ser Glu
130 135 140

Ile Ser Arg Ile Ala Arg Lys Gly Ser Gly Ser Ala Cys Arg Ser Leu
145 150 155 160

Phe Gly Gly Tyr Val Ala Trp Glu Met Gly Lys Ala Glu Asp Gly His
165 170 175

Asp Ser Met Ala Val Gln Ile Ala Asp Ser Ser Asp Trp Pro Gln Met
180 185 190

Lys Ala Cys Val Leu Val Val Ser Asp Ile Lys Lys Asp Val Ser Ser
195 200 205

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

Arg Ile Glu His Val Val Pro Lys Arg Phe Glu Val Met Arg Lys Ala
225 230 235 240

Ile Val Glu Lys Asp Phe Ala Thr Phe Ala Lys Glu Thr Met Met Asp
245 250 255

ES 2 478 844 T3

Ser Asn Ser Phe His Ala Thr Cys Leu Asp Ser Phe Pro Pro Ile Phe
 260 265 270

Tyr Met Asn Asp Thr Ser Lys Arg Ile Ile Ser Trp Cys His Thr Ile
 275 280 285

Asn Gln Phe Tyr Gly Glu Thr Ile Val Ala Tyr Thr Phe Asp Ala Gly
 290 295 300

Pro Asn Ala Val Leu Tyr Tyr Leu Ala Glu Asn Glu Ser Lys Leu Phe
 305 310 315 320

Ala Phe Ile Tyr Lys Leu Phe Gly Ser Val Pro Gly Trp Asp Lys Lys
 325 330 335

Phe Thr Thr Glu Gln Leu Glu Ala Phe Asn His Gln Phe Glu Ser Ser
 340 345 350

Asn Phe Thr Ala Arg Glu Leu Asp Leu Glu Leu Gln Lys Asp Val Ala
 355 360 365

Arg Val Ile Leu Thr Gln Val Gly Ser Gly Pro Gln Glu Thr Asn Glu
 370 375 380

Ser Leu Ile Asp Ala Lys Thr Gly Leu Pro Lys Glu
 385 390 395

<210> 3
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Aspergillus niger

<400> 3

Met Ala Ala Ser Ala Asp Ser Gln Val Phe Arg Ala Thr Thr Thr Ala
 1 5 10 15

Pro Val Asn Ile Ala Val Ile Lys Tyr Trp Gly Lys Arg Asp Ala Val
 20 25 30

Leu Asn Leu Pro Thr Asn Ser Ser Leu Ser Val Thr Leu Ser Gln Arg
 35 40 45

Ser Leu Arg Thr Leu Thr Thr Ala Ser Cys Ala Pro Phe Tyr Pro Ala
 50 55 60

Lys Asp Glu Leu Thr Leu Asn Gly Lys Pro Gln Asp Ile Gln Ser Ser
 65 70 75 80

ES 2 478 844 T3

Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ala Ser Leu Arg Ala His Arg Arg Glu
 85 90 95
 Leu Glu Asp Ala Asn Pro Ser Leu Pro Lys Leu Ser Ser Phe Pro Leu
 100 105 110
 Arg Ile Val Ser Glu Asn Asn Phe Pro Thr Ala Ala Gly Leu Ala Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ala Gly Phe Ala Ala Leu Val Arg Ala Val Ala Asp Leu Tyr
 130 135 140
 Gln Leu Pro Gln Ser Pro Arg Asp Leu Ser Arg Ile Ala Arg Gln Gly
 145 150 155 160
 Ser Gly Ser Ala Cys Arg Ser Leu Met Gly Gly Tyr Val Ala Trp Arg
 165 170 175
 Ala Gly Ser Leu Glu Asp Gly Ser Asp Ser Leu Ala Glu Glu Val Ala
 180 185 190
 Pro Gln Ser His Trp Pro Glu Met Arg Ala Leu Ile Leu Val Val Ser
 195 200 205
 Ala Ala Lys Lys Asp Val Pro Ser Thr Glu Gly Met Gln Thr Thr Val
 210 215 220
 Ala Thr Ser Asn Leu Phe Ala Thr Arg Ala Ser Thr Val Val Pro Glu
 225 230 235 240
 Arg Met Ala Ala Ile Glu Thr Ala Ile Gln Asn Arg Asp Phe Pro Ala
 245 250 255
 Phe Ala Glu Ile Thr Met Arg Asp Ser Asn Ser Phe His Ala Thr Cys
 260 265 270
 Leu Asp Ser Trp Pro Pro Ile Phe Tyr Met Asn Asp Val Ser Arg Ala
 275 280 285
 Ala Val Arg Leu Val His Asp Ile Asn Arg Ala Ile Gly Arg Thr Val
 290 295 300
 Cys Ala Tyr Thr Tyr Asp Ala Gly Pro Asn Ala Val Ile Tyr Tyr Leu
 305 310 315 320
 Glu Lys Asp Thr Glu Leu Val Ala Gly Thr Val Lys Ala Ile Leu Gly

ES 2 478 844 T3

130 135 140

Ile Phe Gly Gly Phe Val Glu Trp His Ala Gly His Asp Asp Gln Ser
 145 150 155 160

Ser Tyr Ala Glu Val Leu Gln Asp Pro Val Asp Trp Asp Ile Gln Met
 165 170 175

Ile Ala Val Val Leu Lys Ala Thr Lys Lys Thr Ile Ser Ser Thr Asp
 180 185 190

Gly Met Ala Arg Val Val Ala Thr Ser Pro Tyr Tyr Pro Ala Trp Ile
 195 200 205

Thr Thr Ala Glu Thr Asp Leu Lys Arg Met Arg Gln Ala Ile Ala Asp
 210 215 220

Arg Asp Leu Thr Thr Val Gly Gln Ile Ala Glu Thr Asn Ala Met Arg
 225 230 235 240

Met His Ala Leu Asn Leu Ser Ala Glu Pro Ala Phe Asn Tyr Phe Thr
 245 250 255

Ala Asp Thr Leu Thr Ala Ile Gln Ala Val Asn Asp Leu Arg Ser His
 260 265 270

Gly Ile Asn Cys Tyr Tyr Thr Leu Asp Ala Gly Pro Asn Val Lys Ile
 275 280 285

Ile Cys Ala Gly Gln Asp Thr Asp Thr Ile Met Thr Gly Leu Gln Gln
 290 295 300

His Phe Asp Ala Asp Gln Leu Ile Val Ala Lys Pro Gly Pro Gly Ile
 305 310 315 320

Thr Ile Thr Glu Lys
 325

<210> 5
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pyrogenes

<400> 5

Met Asp Pro Asn Val Ile Thr Val Thr Ser Tyr Ala Asn Ile Ala Ile
 1 5 10 15

Ile Lys Tyr Trp Gly Lys Glu Asn Gln Ala Lys Met Ile Pro Ser Thr

ES 2 478 844 T3

			20					25						30		
Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Thr	Leu	Glu	Asn	Met	Phe	Thr	Thr	Thr	Ser	Val	
		35					40						45			
Ser	Phe	Leu	Pro	Asp	Thr	Ala	Thr	Ser	Asp	Gln	Phe	Tyr	Ile	Asn	Gly	
	50					55					60					
Ile	Leu	Gln	Asn	Asp	Glu	Glu	His	Thr	Lys	Ile	Ser	Ala	Ile	Ile	Asp	
65					70					75					80	
Gln	Phe	Arg	Gln	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Val	Lys	Met	Glu	Thr	Gln	Asn	
				85					90					95		
Asn	Met	Pro	Thr	Ala	Ala	Gly	Leu	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	
			100					105						110		
Ala	Leu	Val	Lys	Ala	Cys	Asp	Gln	Leu	Phe	Asp	Thr	Gln	Leu	Asp	Gln	
		115					120					125				
Lys	Ala	Leu	Ala	Gln	Lys	Ala	Lys	Phe	Ala	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Arg	
	130					135					140					
Ser	Phe	Phe	Gly	Pro	Val	Ala	Ala	Trp	Asp	Lys	Asp	Ser	Gly	Ala	Ile	
145					150					155					160	
Tyr	Lys	Val	Glu	Thr	Asp	Leu	Lys	Met	Ala	Met	Ile	Met	Leu	Val	Leu	
				165					170					175		
Asn	Ala	Ala	Lys	Lys	Pro	Ile	Ser	Ser	Arg	Glu	Gly	Met	Lys	Leu	Cys	
			180					185					190			
Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Thr	Phe	Asp	Gln	Trp	Val	Glu	Gln	Ser	Ala	Ile	
		195					200					205				
Asp	Tyr	Gln	His	Met	Leu	Thr	Tyr	Leu	Lys	Thr	Asn	Asn	Phe	Glu	Lys	
	210					215					220					
Val	Gly	Gln	Leu	Thr	Glu	Ala	Asn	Ala	Leu	Ala	Met	His	Ala	Thr	Thr	
225					230					235					240	
Lys	Thr	Ala	Asn	Pro	Pro	Phe	Ser	Tyr	Leu	Thr	Lys	Glu	Ser	Tyr	Gln	
			245						250					255		
Ala	Met	Glu	Ala	Val	Lys	Glu	Leu	Arg	Gln	Glu	Gly	Phe	Ala	Cys	Tyr	
			260					265					270			

ES 2 478 844 T3

Phe Thr Met Asp Ala Gly Pro Asn Val Lys Val Leu Cys Leu Glu Lys
 275 280 285

Asp Leu Ala Gln Leu Ala Glu Arg Leu Gly Lys Asn Tyr Arg Ile Ile
 290 295 300

Val Ser Lys Thr Lys Asp Leu Pro Asp Val
 305 310

<210> 6
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> *Picrophilus torridus* DSM 9790

<400> 6

Met Glu Asn Tyr Asn Val Lys Thr Arg Ala Phe Pro Thr Ile Gly Ile
 1 5 10 15

Ile Leu Leu Gly Gly Ile Ser Asp Lys Lys Asn Arg Ile Pro Leu His
 20 25 30

Thr Thr Ala Gly Ile Ala Tyr Thr Gly Ile Asn Asn Asp Val Tyr Thr
 35 40 45

Glu Thr Lys Leu Tyr Val Ser Lys Asp Glu Lys Cys Tyr Ile Asp Gly
 50 55 60

Lys Glu Ile Asp Leu Asn Ser Asp Arg Ser Pro Ser Lys Val Ile Asp
 65 70 75 80

Lys Phe Lys His Glu Ile Leu Met Arg Val Asn Leu Asp Asp Glu Asn
 85 90 95

Asn Leu Ser Ile Asp Ser Arg Asn Phe Asn Ile Leu Ser Gly Ser Ser
 100 105 110

Asp Ser Gly Ala Ala Ala Leu Gly Glu Cys Ile Glu Ser Ile Phe Glu
 115 120 125

Tyr Asn Ile Asn Ile Phe Thr Phe Glu Asn Asp Leu Gln Arg Ile Ser
 130 135 140

Glu Ser Val Gly Arg Ser Leu Tyr Gly Gly Leu Thr Val Asn Tyr Ala
 145 150 155 160

Asn Gly Arg Glu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Leu Glu Pro Glu Ala Phe
 165 170 175

ES 2 478 844 T3

Asn Asn Phe Thr Ile Ile Gly Ala His Phe Asn Ile Asp Arg Lys Pro
180 185 190

Ser Asn Glu Ile His Glu Asn Ile Ile Lys His Glu Asn Tyr Arg Glu
195 200 205

Arg Ile Lys Ser Ala Glu Arg Lys Ala Lys Lys Leu Glu Glu Leu Ser
210 215 220

Arg Asn Ala Asn Ile Lys Gly Ile Phe Glu Leu Ala Glu Ser Asp Thr
225 230 235 240

Val Glu Tyr His Lys Met Leu His Asp Val Gly Val Asp Ile Ile Asn
245 250 255

Asp Arg Met Glu Asn Leu Ile Glu Arg Val Lys Glu Met Lys Asn Asn
260 265 270

Phe Trp Asn Ser Tyr Ile Val Thr Gly Gly Pro Asn Val Phe Val Ile
275 280 285

Thr Glu Lys Lys Asp Val Asp Lys Ala Met Glu Gly Leu Asn Asp Leu
290 295 300

Cys Asp Asp Ile Arg Leu Leu Lys Val Ala Gly Lys Pro Gln Val Ile
305 310 315 320

Ser Lys Asn Phe

<210> 7
<211> 319
<212> PRT
<213> *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
<400> 7

Met Ser Lys Thr Ala Arg Ala His Thr Asn Ile Ala Leu Ile Lys Tyr
1 5 10 15

Trp Gly Lys Lys Asp Ala Lys Leu Arg Leu Pro Leu Met Ser Ser Leu
20 25 30

Ser Met Thr Leu Asp Ala Phe Tyr Ser Asp Thr Lys Ile Ser Asp Ser
35 40 45

Glu Gln Met Ser Phe Lys Leu Asn Gly Gln Ala Val Ser Gly Pro Ala
50 55 60

ES 2 478 844 T3

Ala Asp Arg Val Phe Ala Tyr Leu Arg Ala Met Gln Asp Arg Phe Gly
65 70 75 80

Val Lys Gly Asn Leu Ala Val Glu Ser Val Asn Gln Val Pro Thr Ala
85 90 95

Ala Gly Leu Ala Ser Ser Ser Ser Ala Phe Ala Ala Met Ala Ala Ala
100 105 110

Phe Ala Asp His Tyr Gln Leu Gly Val Asp Arg Gln Glu Leu Ser Arg
115 120 125

Met Ala Arg Met Gly Ser Gly Ser Ala Ser Arg Ser Val Phe Gly Gly
130 135 140

Phe Ser Val Trp Gln Lys Gly Asp Ser Asp Gln Thr Ser Tyr Ala Tyr
145 150 155 160

Pro Leu Asp Glu Glu Pro Asp Met Asp Leu Arg Leu Leu Ala Val Glu
165 170 175

Ile Asn Asp Gln Glu Lys Lys Ile Ser Ser Thr Lys Gly Met Glu Met
180 185 190

Ser Lys Ser Ser Pro Phe Tyr Gln Val Trp Leu Asp Arg Asn Asp Ser
195 200 205

Glu Ile Lys Glu Met Glu Glu Ala Ile Lys Gln Ala Asp Phe Ser Lys
210 215 220

Leu Gly Ser Leu Ala Glu Leu Asn Ala Ser Glu Met His Thr Leu Thr
225 230 235 240

Phe Thr Ala Val Pro Gly Phe Thr Tyr Phe Glu Pro Asn Thr Ile Lys
245 250 255

Ala Ile Lys Leu Val Gln Asp Leu Arg Gln Gln Gly Leu Glu Cys Tyr
260 265 270

Tyr Thr Ile Asp Ala Gly Pro Asn Val Lys Val Leu Cys Gln Gly Lys
275 280 285

Asn Ser Lys Asp Ile Ile Asn Cys Phe Glu Ser Ser Phe Asp Arg Val
290 295 300

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

ES 2 478 844 T3

<210> 8
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Haloquadratum walsbyi DSM 16790

 <400> 8

 Met Lys Ala Thr Ala Arg Ala His Pro Ile Gln Gly Leu Ile Lys Tyr
 1 5 10 15

 His Gly Met Arg Asp Ser Asp Lys Arg Tyr Pro Tyr His Asp Ser Ile
 20 25 30

 Ser Val Cys Thr Ala Pro Ser Ala Thr Thr Thr Thr Val Glu Phe Gln
 35 40 45

 Ser Asp Ala Ser Gly Asp Val Tyr Ile Ile Asp Asn Glu Arg Val Asp
 50 55 60

 Gly Arg Ala Ala Glu Arg Ile Asp Ala Val Val Glu His Val Arg Glu
 65 70 75 80

 Arg Thr Gly Ile Arg Asp Pro Val Arg Leu Val Ser Thr Asn Ser Phe
 85 90 95

 Pro Ser Asn Ile Gly Phe Gly Ser Ser Ser Ser Gly Phe Ala Ala Ala
 100 105 110

 Ala Met Ala Leu Val Thr Ala Ala Gly Glu Glu Leu Thr His Pro Glu
 115 120 125

 Ile Ser Thr Ile Ala Arg Arg Gly Ser Ser Ser Ala Ala Arg Ala Val
 130 135 140

 Thr Gly Ala Phe Ser Gln Leu Tyr Ser Gly Met Asn Asp Thr Asp Cys
 145 150 155 160

 His Ala Glu Arg Ile Glu Thr Asp Leu Asp Ala Thr Val Arg Thr Val
 165 170 175

 Ala Ala His Val Pro Ala Tyr Lys Glu Thr Glu Glu Ala His Arg Glu
 180 185 190

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

 Gln Ile Asp Ala Met Arg Asp Ala Leu Tyr Asn Ala Asp Phe Asp Arg
 210 215 220

ES 2 478 844 T3

Ile Phe Glu Leu Ala Glu His Asp Ser Leu Ser Leu Thr Ala Ala Thr
 225 230 235 240

Met Thr Gly Pro Ala Gly Trp Val Tyr Trp Gln Pro Gln Thr Ile Ala
 245 250 255

Val Phe Asn Thr Val Arg Glu Leu Arg Glu Arg Glu Ser Ile Pro Val
 260 265 270

Tyr Phe Ser Thr Asp Thr Gly Ala Ser Val Tyr Val Asn Thr Thr Ala
 275 280 285

Ala His Val Asp Thr Val Glu Ser Ala Ile Ser Asp Ile Gly Ile Asp
 290 295 300

Thr Asp Ile Trp Thr Val Gly Gly Pro Ala Thr Val Leu Ser Ala Ser
 305 310 315 320

Asp Ser Leu Phe

<210> 9
 <211> 322
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus salivarius subsp. salivarius (cepa UCC118)
 <400> 9

Met Ser Asn His Ala Ala Ala Arg Ala His Thr Asn Ile Ala Leu Ile
 1 5 10 15

Lys Tyr Trp Gly Lys Lys Asp Thr Glu Leu Ile Leu Pro Met Asn Asn
 20 25 30

Ser Leu Ser Leu Thr Leu Asp His Phe Tyr Thr Asp Thr Ser Val Thr
 35 40 45

Phe Asp Ser Ser Tyr Thr Lys Asp Thr Phe Ile Leu Asn Gly Lys Glu
 50 55 60

Ile Pro Asn Glu Asn Val His Lys Phe Leu Asn Ile Val Arg Glu Lys
 65 70 75 80

Ala Gly Ile Ser Glu Phe Ala Lys Val Asn Ser Thr Asn His Val Pro
 85 90 95

Thr Thr Ala Gly Leu Ala Ser Ser Ala Ser Ala Phe Ala Ala Leu Ala
 100 105 110

ES 2 478 844 T3

Ala Ala Ala Ser Lys Ala Ser Gly Met Asn Leu Ser Arg Arg Asp Leu
115 120 125

Ser Arg Leu Ala Arg Arg Gly Ser Gly Ser Ala Thr Arg Ser Ile Tyr
130 135 140

Gly Gly Phe Val Glu Trp Gln Ala Gly Asp Asn Asp Leu Asn Ser Tyr
145 150 155 160

Ala Val Pro Phe Ile Glu Asn Val Ser Trp Asp Ile Lys Met Ile Ala
165 170 175

Val Val Ile Asn Ser Lys Pro Lys Lys Ile Thr Ser Arg Ala Gly Met
180 185 190

Gln Thr Val Val Asn Thr Ser Pro Tyr Tyr Asn Ser Trp Ile Lys Glu
195 200 205

Ala Asn Arg Ser Ile Pro Leu Met Lys Glu Ala Ile Ser Lys Gln Asp
210 215 220

Phe Thr Thr Met Gly Glu Leu Ala Glu Glu Asn Ala Met Lys Met His
225 230 235 240

Ala Leu Asn Leu Ser Ala His Pro His Phe Ser Tyr Phe Ser Pro Glu
245 250 255

Ser Ile Gln Val Met Asn Leu Val Glu Glu Leu Arg Ser Met Gly Ile
260 265 270

Glu Cys Tyr Tyr Thr Met Asp Ala Gly Pro Asn Val Lys Ile Ile Cys
275 280 285

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

Pro Asn Thr Glu Val Leu Val Ser Ser Ala Gly Pro Gly Val Gln Tyr
305 310 315 320

Leu Asp

<210> 10
<211> 314
<212> PRT
<213> Oenococcus oeni (cepa BAA-331 / PSU-1)
<400> 10

ES 2 478 844 T3

Met Ala Lys Val Arg Ala Tyr Thr Asn Ile Ala Leu Ile Lys Tyr Trp
 1 5 10 15

Gly Lys Ser Asp Leu Asn Trp Asn Leu Pro Thr Ser Ser Ser Ile Gly
 20 25 30

Leu Thr Leu Asp Arg Phe Tyr Thr Asp Thr Ser Val Glu Ile Asp Gln
 35 40 45

Phe Ser Lys Lys Asp Phe Phe Gln Leu Asn Gly Gln Gln Ile Glu Gly
 50 55 60

Pro Lys Ile Ser Lys Ile Ile Asn Phe Ile Arg Asn Ser Cys Gly Asn
 65 70 75 80

Lys Asn Phe Val Lys Val Ile Ser Glu Asn His Val Pro Thr Ser Ala
 85 90 95

Gly Leu Ala Ser Ser Ala Ser Ala Phe Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ala
 100 105 110

Asn Gln Ala Phe Gly Leu Glu Leu Asp Asn Arg Glu Leu Ser Lys Ile
 115 120 125

Ala Arg Ile Gly Ser Gly Ser Ala Ser Arg Ser Ile Phe Gly Gly Phe
 130 135 140

Ser Ile Trp His Lys Gly Gln Asn Lys Asp Asp Ser Phe Ala Glu Ser
 145 150 155 160

Ile Leu Asp Pro Val Asp Phe Asp Ile Arg Val Ile Asp Ile Leu Ala
 165 170 175

Asp Lys Arg Val Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gln Gly Met Gln Leu Ala
 180 185 190

Gln Thr Ser Pro Asn Tyr Asp Ser Trp Leu Lys Lys Asn Asp Arg Gln
 195 200 205

Ile Asp Glu Met Leu Lys Ala Ile Ser Asp His Asp Leu Glu Lys Ile
 210 215 220

Gly Leu Ile Ala Glu Thr Asn Ser Ala Ser Met His Glu Leu Asn Arg
 225 230 235 240

Thr Ala Lys Val Pro Phe Asp Tyr Phe Thr Glu Asn Thr Arg Glu Ile
 245 250 255

ES 2 478 844 T3

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

Thr Val Asp Ala Gly Pro Asn Val Lys Val Ile Thr Asn Ser Glu Tyr
 275 280 285

Gln Glu Lys Ile Ile Asn Val Leu Lys Glu Tyr Gly Glu Ile Leu Val
 290 295 300

Gln Lys Pro Gly Arg Gly Val Ala Asn Val
 305 310

<210> 11
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745

<400> 11

Met Asn Glu Lys His Gly Phe Ala Arg Ala His Thr Asn Ile Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Lys Tyr Trp Gly Lys Ile Asn Ser Asp Leu Ile Leu Pro Ala Asn
 20 25 30

Asp Ser Ile Ser Leu Thr Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Asp Thr Glu Val
 35 40 45

Thr Phe Ser Asp Glu Tyr Thr Ser Asn Leu Phe Tyr Leu Asn His Gln
 50 55 60

Leu Ile Asp Val Lys Lys Met Gln Arg Ile Asn Arg Val Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Val Lys Ser Glu Phe Gly Tyr Gln Gly Phe Ala Lys Ile Glu Ser Glu
 85 90 95

Asn His Val Pro Thr Ala Ala Gly Leu Ala Ser Ser Ala Ser Gly Met
 100 105 110

Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ala Val Ser Ala Leu Gly Ser His Thr Asp
 115 120 125

Leu Thr Asn Leu Ser Arg Leu Ala Arg Leu Gly Ser Gly Ser Ala Ser
 130 135 140

Arg Ser Val Phe Gly Gly Ile Val His Trp His Arg Gly Tyr Asp His
 145 150 155 160

ES 2 478 844 T3

Gln Ser Ser Phe Ala Glu Gln Ile Val Ser Glu Asp Gln Ile Asp Leu
 165 170 175

Asn Met Val Thr Ile Val Ile Asp Arg Arg Gln Lys Lys Val Lys Ser
 180 185 190

Thr Leu Gly Met Gln His Thr Ala Ser Thr Ser Pro Phe Tyr Pro Ala
 195 200 205

Trp Val Glu Ala Thr Asn Gln Ala Ile Pro Glu Met Ile Ser Ala Val
 210 215 220

Gln Asn Asn Asp Phe Thr Lys Ile Gly Glu Leu Ala Glu His Ser Ala
 225 230 235 240

Ala Met Met His Ala Thr Thr Leu Ser Ser Lys Pro Ala Phe Thr Tyr
 245 250 255

Phe Ala Pro Glu Thr Ile Gln Ala Ile Lys Leu Val Glu Gln Leu Arg
 260 265 270

Glu Ser Gly Ile Glu Cys Tyr Tyr Thr Ile Asp Ala Gly Pro Asn Val
 275 280 285

Lys Val Leu Cys Gln Ser Lys Asn Ile Thr Arg Val Lys Arg Phe Phe
 290 295 300

Ala Ser Tyr Phe Asp Gln Asp Gln Leu Val Val Ala Lys Pro Gly Ser
 305 310 315 320

Gly Ile Lys Phe Thr Lys Asn
 325

<210> 12
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> Streptococcus gordonii

<400> 12

Met Asp Arg Lys Pro Val Ser Val Lys Ser Tyr Ala Asn Ile Ala Ile
 1 5 10 15

Val Lys Tyr Trp Gly Lys Lys Asp Ala Glu Lys Met Ile Pro Ser Thr
 20 25 30

Ser Ser Ile Ser Leu Thr Leu Glu Asn Met Tyr Thr Glu Thr Gln Leu
 35 40 45

ES 2 478 844 T3

Ser Pro Leu Pro Asp Thr Ala Thr Gly Asp Glu Phe Tyr Ile Asp Gly
50 55 60

Gln Leu Gln Ser Pro Ala Glu His Ala Lys Ile Ser Lys Ile Ile Asp
65 70 75 80

Arg Phe Arg Ser Pro Glu Asp Gly Phe Val Arg Val Asp Thr Ser Asn
85 90 95

Asn Met Pro Thr Ala Ala Gly Leu Ser Ser Ser Ser Ser Gly Leu Ser
100 105 110

Ala Leu Val Lys Ala Cys Asn Ala Tyr Phe Gln Thr Gly Tyr Gln Thr
115 120 125

Glu Glu Leu Ala Gln Leu Ala Lys Phe Ala Ser Gly Ser Ser Ala Arg
130 135 140

Ser Phe Phe Gly Pro Leu Ala Ala Trp Asp Lys Asp Ser Gly Ala Ile
145 150 155 160

Tyr Pro Val Lys Thr Asp Leu Lys Leu Ala Met Ile Met Leu Val Leu
165 170 175

His Asp Glu Lys Lys Pro Ile Ser Ser Arg Asp Gly Met Glu Leu Cys
180 185 190

Ala Lys Thr Ser Thr Ile Phe Pro Asp Trp Ile Ala Gln Ser Ala Leu
195 200 205

Asp Tyr Gln Ala Met Leu Gly Tyr Leu Gln Asp Asn Asp Phe Ala Lys
210 215 220

Val Gly Gln Leu Thr Glu Glu Asn Ala Leu Arg Met His Ala Thr Thr
225 230 235 240

Glu Lys Ala Tyr Pro Pro Phe Ser Tyr Leu Thr Glu Glu Ser Tyr Gln
245 250 255

Ala Met Asp Ala Val Arg Lys Leu Arg Glu Gln Gly Glu Arg Cys Tyr
260 265 270

Phe Thr Met Asp Ala Gly Pro Asn Val Lys Val Leu Cys Leu Glu Glu
275 280 285

Asp Leu Asp His Leu Ala Ala Ile Phe Glu Lys Asp Tyr Arg Leu Ile

ES 2 478 844 T3

290 295 300

Val Ser Lys Thr Lys Asp Leu Ser Asp Glu Ser
 305 310 315

<210> 13
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Dichelobacter nodosus VCS1703A

<400> 13

Met His Ser Ala Thr Ala Phe Ala Pro Ala Asn Ile Ala Leu Ala Lys
 1 5 10 15

Tyr Trp Gly Lys Arg Asp Ala Gln Leu Asn Leu Pro Thr Asn Gly Ser
 20 25 30

Leu Ser Ile Ser Leu Ala His Leu Gly Thr Thr Thr Thr Ile Ser Ala
 35 40 45

Gly Glu Arg Asp Gln Leu Tyr Cys Asp His Arg Leu Leu Pro Pro Asp
 50 55 60

Thr Ala Phe Val Gln Lys Val Trp His Phe Ile Asp Phe Cys Gln Pro
 65 70 75 80

Lys Arg Pro Pro Leu Val Ile His Thr Gln Asn Asn Ile Pro Thr Ala
 85 90 95

Ala Gly Leu Ala Ser Ser Ala Ser Gly Phe Ala Ala Leu Thr Leu Ala
 100 105 110

Leu Asn Asp Phe Phe Gln Trp Ser Leu Ser Arg Glu Gln Leu Ser Gln
 115 120 125

Ile Ala Arg Arg Gly Ser Gly Ser Ala Cys Arg Ser Leu Trp Gln Gly
 130 135 140

Phe Val Tyr Trp Gln Lys Gly Glu Lys Ala Asp Gly Ser Asp Cys Tyr
 145 150 155 160

Ala Arg Pro Ile Ala Ser Asp Trp Gln Asp Leu Arg Leu Gly Ile Ile
 165 170 175

Thr Ile Asp Ala Ala Ala Lys Lys Ile Ser Ser Arg Gln Ala Met Asn
 180 185 190

His Thr Ala Ala Ser Ser Pro Leu Phe Ser Ser Trp Thr Gln Ala Ala

ES 2 478 844 T3

<400> 15

Met Asp Pro Asn Val Ile Thr Val Thr Ser Tyr Ala Asn Ile Ala Ile
1 5 10 15

Ile Lys Tyr Trp Gly Lys Glu Asn Gln Ala Lys Met Ile Pro Ser Thr
20 25 30

Ser Ser Ile Ser Leu Thr Leu Glu Asn Met Phe Thr Thr Thr Ser Val
35 40 45

Ser Phe Leu Pro Asp Thr Ala Thr Ser Asp Gln Phe Tyr Ile Asn Gly
50 55 60

Val Leu Gln Asn Asp Glu Glu His Thr Lys Ile Ser Ala Ile Ile Asp
65 70 75 80

Gln Phe Arg Gln Pro Gly Gln Ala Phe Val Lys Met Glu Thr Gln Asn
85 90 95

Asn Met Pro Thr Ala Ala Gly Leu Ser Ser Ser Ser Gly Leu Ser
100 105 110

Ala Leu Val Lys Ala Cys Asp Gln Leu Phe Asn Thr Gln Leu Asp Gln
115 120 125

Lys Ala Leu Ala Gln Lys Ala Lys Phe Ala Ser Gly Ser Ser Ser Arg
130 135 140

Ser Phe Phe Gly Pro Val Ala Ala Trp Asp Lys Asp Ser Gly Ala Ile
145 150 155 160

Tyr Lys Val Glu Thr Asp Leu Lys Met Ala Met Ile Met Leu Val Leu
165 170 175

Asn Ala Ala Lys Lys Pro Ile Ser Ser Arg Glu Gly Met Lys Leu Cys
180 185 190

Arg Asp Thr Ser Thr Thr Phe Asp Glu Trp Val Glu Gln Ser Ala Ile
195 200 205

Asp Tyr Gln His Met Leu Thr Tyr Leu Lys Thr Asn Asn Phe Glu Lys
210 215 220

Val Gly Gln Leu Thr Glu Ala Asn Ala Leu Ala Met His Ala Thr Thr
225 230 235 240

ES 2 478 844 T3

Lys Thr Ala Asn Pro Pro Phe Ser Tyr Leu Thr Lys Glu Ser Tyr Gln
245 250 255

Ala Met Glu Ala Val Lys Glu Leu Arg Gln Glu Gly Phe Ala Cys Tyr
260 265 270

Phe Thr Met Asp Ala Gly Pro Asn Val Lys Val Leu Cys Leu Glu Lys
275 280 285

Asp Leu Ala Gln Leu Ala Glu Arg Leu Gly Lys Asn Tyr Arg Ile Ile
290 295 300

Val Ser Lys Thr Lys Asp Leu Pro Asp Val
305 310

<210> 16
<211> 330
<212> PRT
<213> *Picrophilus torridus* DSM 9790

<400> 16

Met His His His His His His Glu Asn Tyr Asn Val Lys Thr Arg Ala
1 5 10 15

Phe Pro Thr Ile Gly Ile Ile Leu Leu Gly Gly Ile Ser Asp Lys Lys
20 25 30

Asn Arg Ile Pro Leu His Thr Thr Ala Gly Ile Ala Tyr Thr Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Asp Val Tyr Thr Glu Thr Lys Leu Tyr Val Ser Lys Asp Glu
50 55 60

Lys Cys Tyr Ile Asp Gly Lys Glu Ile Asp Leu Asn Ser Asp Arg Ser
65 70 75 80

Pro Ser Lys Val Ile Asp Lys Phe Lys His Glu Ile Leu Met Arg Val
85 90 95

Asn Leu Asp Asp Glu Asn Asn Leu Ser Ile Asp Ser Arg Asn Phe Asn
100 105 110

Ile Leu Ser Gly Ser Ser Asp Ser Gly Ala Ala Ala Leu Gly Glu Cys
115 120 125

Ile Glu Ser Ile Phe Glu Tyr Asn Ile Asn Ile Phe Thr Phe Glu Asn
130 135 140

ES 2 478 844 T3

Asp Leu Gln Arg Ile Ser Glu Ser Val Gly Arg Ser Leu Tyr Gly Gly
145 150 155 160

Leu Thr Val Asn Tyr Ala Asn Gly Arg Glu Ser Leu Thr Glu Pro Leu
165 170 175

Leu Glu Pro Glu Ala Phe Asn Asn Phe Thr Ile Ile Gly Ala His Phe
180 185 190

Asn Ile Asp Arg Lys Pro Ser Asn Glu Ile His Glu Asn Ile Ile Lys
195 200 205

His Glu Asn Tyr Arg Glu Arg Ile Lys Ser Ala Glu Arg Lys Ala Lys
210 215 220

Lys Leu Glu Glu Leu Ser Arg Asn Ala Asn Ile Lys Gly Ile Phe Glu
225 230 235 240

Leu Ala Glu Ser Asp Thr Val Glu Tyr His Lys Met Leu His Asp Val
245 250 255

Gly Val Asp Ile Ile Asn Asp Arg Met Glu Asn Leu Ile Glu Arg Val
260 265 270

Lys Glu Met Lys Asn Asn Phe Trp Asn Ser Tyr Ile Val Thr Gly Gly
275 280 285

Pro Asn Val Phe Val Ile Thr Glu Lys Lys Asp Val Asp Lys Ala Met
290 295 300

Glu Gly Leu Asn Asp Leu Cys Asp Asp Ile Arg Leu Leu Lys Val Ala
305 310 315 320

Gly Lys Pro Gln Val Ile Ser Lys Asn Phe
325 330

<210> 17
<211> 327
<212> PRT
<213> Thermoplasma volcanium

<400> 17

Met Leu His His His His His Ser Asn Ser Ser Ile Thr Ser Val
1 5 10 15

Ala Tyr Pro Thr Ile Gly Val Val Leu Leu Gly Gly Ile Ala Asn Glu
20 25 30

ES 2 478 844 T3

Lys Thr Arg Thr Pro Leu His Thr Ser Ala Gly Ile Ala Tyr Thr Asp
 35 40 45
 Ser Cys Gly Ser Ile Arg Thr Glu Ser Thr Ile Tyr Gly Asp Ser Glu
 50 55 60
 Met His Ile Tyr Phe Asn Gly Thr Glu Ser Lys Asp Glu Asn Arg Ser
 65 70 75 80
 Val Lys Ser Val Leu Glu Arg Tyr Arg Asn Glu Leu Gln Ser Phe Phe
 85 90 95
 Gly Lys Lys Asp Val Ser Tyr Ser Ser Leu Asn Tyr Gly Ile Leu Ser
 100 105 110
 Gly Ser Ser Asp Ala Gly Ala Ala Ser Ile Gly Ala Ile Leu Ser Phe
 115 120 125
 Ile Asp Lys Lys Asn Asp Ile His Asp Ile Glu Asn Asp Ile Arg Met
 130 135 140
 Ile Ser Glu Ser Ala Gly Arg Ser Leu His Gly Gly Leu Thr Ile Thr
 145 150 155 160
 Trp Ser Asp Gly Tyr Ser Ala Tyr Thr Glu Arg Val Leu Gly Pro Glu
 165 170 175
 His Phe Asn Asn Tyr Ala Ile Val Gly Phe Ser Phe Asp Tyr Pro Arg
 180 185 190
 Asn Pro Ser Asp Thr Ile His Gln Asn Ile Ile Lys Ser Lys Arg Tyr
 195 200 205
 Lys Gln Arg Thr Ile Asp Ala Asp Glu His Ala His Glu Ile Lys Glu
 210 215 220
 Met Ala Arg Thr Asp Asp Ile Glu Gly Ile Phe Glu Lys Ala Glu Glu
 225 230 235 240
 Asp Thr Glu Glu Tyr His Ser Ile Leu Arg Glu Val Gly Val Leu Val
 245 250 255
 Ile Arg Glu Asn Met Gln Lys Leu Ile Glu Phe Ile Lys Ile Leu Arg
 260 265 270
 Lys Glu Phe Trp Asn Ser Tyr Ile Val Thr Gly Gly Ser Asn Val Tyr
 275 280 285

ES 2 478 844 T3

Val Ile Val Arg Arg Asp Asp Leu Glu Arg Leu Ile His Ile Lys Asn
 290 295 300

Thr Phe Gly Ser Lys Pro Lys Ile Leu Asn Val Ala Gly Pro Ala Trp
 305 310 315 320

Ile Lys Lys Val Glu Ser Asp
 325

<210> 18
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> Thermoplasma acidophilum

<400> 18

Met Leu His His His His His His Thr Tyr Arg Ser Ile Gly Ser Thr
 1 5 10 15

Ala Tyr Pro Thr Ile Gly Val Val Leu Leu Gly Gly Ile Ala Asn Pro
 20 25 30

Val Thr Arg Thr Pro Leu His Thr Ser Ala Gly Ile Ala Tyr Ser Asp
 35 40 45

Ser Cys Gly Ser Ile Arg Ser Glu Thr Arg Ile Tyr Ala Asp Glu Ala
 50 55 60

Thr His Ile Tyr Phe Asn Gly Thr Glu Ser Thr Asp Asp Asn Arg Ser
 65 70 75 80

Val Arg Arg Val Leu Asp Arg Tyr Ser Ser Val Phe Glu Glu Ala Phe
 85 90 95

Gly Thr Lys Thr Val Ser Tyr Ser Ser Gln Asn Phe Gly Ile Leu Ser
 100 105 110

Gly Ser Ser Asp Ala Gly Ala Ala Ser Ile Gly Ala Ala Ile Leu Gly
 115 120 125

Leu Lys Pro Asp Leu Asp Pro His Asp Val Glu Asn Asp Leu Arg Ala
 130 135 140

Val Ser Glu Ser Ala Gly Arg Ser Leu Phe Gly Gly Leu Thr Ile Thr
 145 150 155 160

Trp Ser Asp Gly Phe His Ala Tyr Thr Glu Lys Ile Leu Asp Pro Glu
 165 170 175

ES 2 478 844 T3

Ala Phe Ser Gly Tyr Ser Ile Val Ala Phe Ala Phe Asp Tyr Gln Arg
 180 185 190

Asn Pro Ser Asp Val Ile His Gln Asn Ile Val Arg Ser Asp Leu Tyr
 195 200 205

Pro Ala Arg Lys Lys His Ala Asp Glu His Ala His Met Ile Lys Glu
 210 215 220

Tyr Ala Lys Thr Asn Asp Ile Lys Gly Ile Phe Asp Leu Ala Gln Glu
 225 230 235 240

Asp Thr Glu Glu Tyr His Ser Ile Leu Arg Gly Val Gly Val Asn Val
 245 250 255

Ile Arg Glu Asn Met Gln Lys Leu Ile Ser Tyr Leu Lys Leu Ile Arg
 260 265 270

Lys Asp Tyr Trp Asn Ala Tyr Ile Val Thr Gly Gly Ser Asn Val Tyr
 275 280 285

Val Ala Val Glu Ser Glu Asn Ala Asp Arg Leu Phe Ser Ile Glu Asn
 290 295 300

Thr Phe Gly Ser Lys Lys Lys Met Leu Arg Ile Val Gly Gly Ala Trp
 305 310 315 320

His Arg Arg Pro Glu
 325

<210> 19
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Ferroplasma acidarmanus fer1
 <400> 19

Met His His His His His His Met Glu Lys Tyr Tyr Val Glu Val Lys
 1 5 10 15

Ala Tyr Pro Thr Ile Gly Ile Leu Leu Leu Gly Gly Val Ser Asp Asn
 20 25 30

Lys Lys Arg Leu Pro Arg His Thr Thr Ala Gly Ile Ala Tyr Thr Gly
 35 40 45

Leu Asp Asp Asp Ile Tyr Val Lys Thr Asp Leu Tyr Leu Ser Asn Gln
 50 55 60

ES 2 478 844 T3

Lys Ser Gly Ile Ile Asn Gly Lys Glu Val Ser Pro Asp Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Ser Pro Phe Val Val Ile Asp Lys Tyr Arg His Glu Ile Leu Met Arg
 85 90 95
 His Pro Glu Tyr Ser Glu Val Ser Phe Val Ser Glu Asn Lys Asn Val
 100 105 110
 Ile Ser Gly Ser Ser Asp Ala Gly Ala Ala Ala Ile Gly Glu Cys Ile
 115 120 125
 Gln Ser Ile Phe Glu Tyr Asn Ile Asn Ile Phe Asn Phe Glu Asn Asp
 130 135 140
 Leu Gln Gln Ile Ser Glu Ser Ala Gly Arg Ser Met Phe Gly Gly Phe
 145 150 155 160
 Thr Ile Asn His Ala Asn Gly Lys Glu Ser Leu Thr Asp Glu Ile Leu
 165 170 175
 Gly Pro Glu Asp Phe Glu Asp Phe Val Ile Val Ala Cys Lys Phe Ser
 180 185 190
 Glu Asp Arg Lys Pro Ser Asp Thr Ile His Ser Asn Ile Ile Asn His
 195 200 205
 Glu Lys Tyr Ala Glu Arg Val Lys Asn Ser Glu Leu Arg Ala Lys Glu
 210 215 220
 Leu Glu Lys Met Ala Asp Ser Gly Asp Ile Lys Gly Ile Phe Glu Ala
 225 230 235 240
 Gly Glu Lys Asp Thr Gln Glu Tyr His Ser Met Leu Arg Glu Val Gly
 245 250 255
 Val Ser Ile Ile Thr Asp Glu Met Gln Arg Leu Ile Glu Lys Val Glu
 260 265 270
 Glu Leu Lys Ala Glu Phe Trp Asn Ala Tyr Ile Val Thr Gly Gly Thr
 275 280 285
 Asn Val Phe Val Ala Val Glu Arg Lys Asn Met Glu Lys Met Lys Asn
 290 295 300
 Ala Ala Met Glu Phe Lys Cys Thr Pro Val Tyr Leu Lys Val Ala Gly
 305 310 315 320

ES 2 478 844 T3

Lys Pro Asp Val Ile Ser Lys Asn Phe
325

<210> 20
<211> 993
<212> ADN
<213> P. torridus (AAT43941) (incluida la etiqueta His)

<400> 20
atgcatcatc accatcacca tgaaaattac aatgttaaga caagggcgtt cccaacaata 60
ggcataatac tgcttggtgg gatctcggat aaaaagaaca ggataccgct gcatacaacg 120
gcaggcatag catatactgg tataaacaat gatgtttaca ctgagacaaa gctttatgta 180
tcaaaagatg aaaaatgcta tattgatgga aaggaaattg atttaaattc agatagatca 240
ccatcgaagg ttattgataa attcaagcat gaaatactta tgagagtaaa tcttgatgat 300
gaaaataacc tttcaattga ttcaaggaac ttaatatat taagtggcag ctcagattct 360
ggggccgctg cactgggaga gtgcatagaa tcaatttttg aatacaatat aaatatattt 420
acatttgaaa acgatcttca gaggatatca gaaagtgttg gaagaagcct ttacggtggt 480
ttaacagtaa actatgccaa tggcagggaa tcattaacag agccattact tgagcctgag 540
gcatttaata actttacaat aattggtgca cattttaaca ttgatagaaa accatcaaat 600
gagattcatg aaaatatcat aaaacatgaa aattacaggg aaagaataaa aagtgctgag 660
agaaaggcga aaaaacttga ggagctatca aggaatgcaa acataaaggg tatctttgaa 720
cttgacagaat ccgatacagt ggaataccat aaaatgctoc atgatgttgg cgttgacata 780
ataaatgata gaatggagaa cctcattgaa agggtaaaag aaatgaaaa taacttctgg 840
aattcataca tagttaccgg cggcccgaac gttttgtaa taacagagaa aaaggacgtt 900
gataaggcaa tggaaggatt aatgatctg tgcgatgata taagattatt aaaagttgca 960
ggaaagccac aggtcatttc aaaaacttt taa 993

<210> 21
<211> 996
<212> ADN
<213> Secuencia optimizada en el codón de P. torridus (AAT43941)
(incluida la etiqueta His)

<400> 21
atgcatcatc atcatcacca cgagaactat aatgttaaaa cccgtgcatt tccgaccatt 60
ggtattattc tgctgggtgg cattagcgac aaaaaaaccc gtattccgct gcataccacc 120
gcaggatttg catataccgg catcaataac gatgtgtaca ccgaaaccaa actgtatgtg 180
agcaaagacg aaaaatgcta tatcgatggc aaagaaatcg atctgaatag cgatcgtagc 240
ccgagcaaag tgatcgataa attcaaacat gaaatcctga tgcgtgtgaa tctggatgat 300

ES 2 478 844 T3

gaaaacaacc tgagcattga tagccgcaat tttaacattc tgagcggtag cagcgatagc	360
ggtgcagcag cactgggtga atgcattgaa agcatcttcg agtacaacat caacatcttc	420
acctttgaaa atgatctgca gcgtattagc gaaagcgttg gtcgtagcct gtatggtggt	480
ctgaccgtta attatgcaaa tggtcgtgaa agcctgaccg aaccgctgct ggaaccgga	540
gcatttaaca actttaccat catcggtgcc cattttaaca ttgatcgcaa accgagcaac	600
gaaatccacg aaaacatcat caaacatgag aactatcgcg aacgtattaa aagcgagag	660
cgcaaagcaa aaaaactgga agaactgagc cgtaatgcca acattaaagg catttttgaa	720
ctggcagaaa gcgataccgt ggaatatcat aaaatgctgc atgatgtggg cgttgatatt	780
atcaatgacc gcatggaaaa tctgattgaa cgcgtgaaag agatgaaaa caacttctgg	840
aacagctata ttgttaccgg tggccgaat gtttttgtga tcaccgagaa aaaagatgtg	900
gataaagcca tgaaggtct gaatgatctg tgtgatgata ttcgtctgct gaaagttgca	960
ggtaaaccgc aggttatcag caaaaacttc taatga	996

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la producción de isoprenol, caracterizado por que comprende la etapa de convertir mevalonato con una enzima que tiene la actividad de una difosfomevalonato descarboxilasa (EC 4.1.1.33) en isoprenol.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la enzima que tiene la actividad de una difosfomevalonato descarboxilasa comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOs: 1 a 16, o es una enzima que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOs: 1 a 16, y que muestra la actividad enzimática de una difosfomevalonato descarboxilasa.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, en el que la enzima que tiene la actividad de una difosfomevalonato descarboxilasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 16, 17, 18 ó 19, o es una enzima que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 30% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 16, 17, 18 ó 19, y que muestra la actividad enzimática de una difosfomevalonato descarboxilasa.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se lleva a cabo in vitro.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se añade un co-sustrato.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en el que el co-sustrato es ATP, un rNTP, un dNTP, un polifosfato o pirofosfato, o una mezcla de cualquiera de estos compuestos.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se caracteriza por que la conversión enzimática se realiza por un organismo que expresa una enzima, que es capaz de catalizar la descarboxilación de mevalonato en isoprenol, y en el que dicha enzima es una enzima que tiene la actividad de una difosfomevalonato descarboxilasa (EC 4.1.1.33).
- 30 8. Uso de una enzima que tiene la actividad de una difosfomevalonato descarboxilasa (EC 4.1.1.33) para producir isoprenol a partir de mevalonato, mediante la descarboxilación de mevalonato.
9. Un método para producir isopreno a partir de mevalonato, que comprende el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y que comprende, además, la etapa de convertir el isoprenol producido en isopreno.
- 35 10. Un método para producir alcohol isoamílico a partir de mevalonato, que comprende el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y que comprende, además, la etapa de convertir el isoprenol producido en alcohol isoamílico.

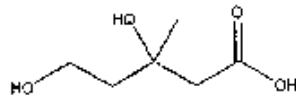


Figura 1

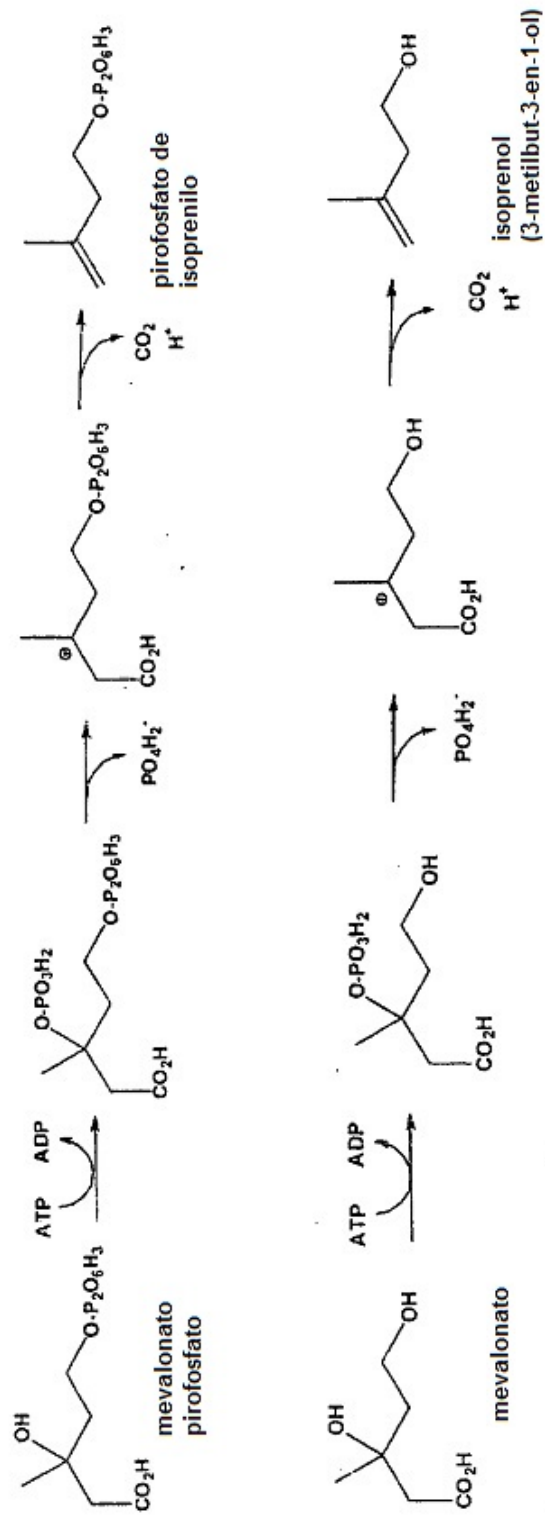


Figura 2

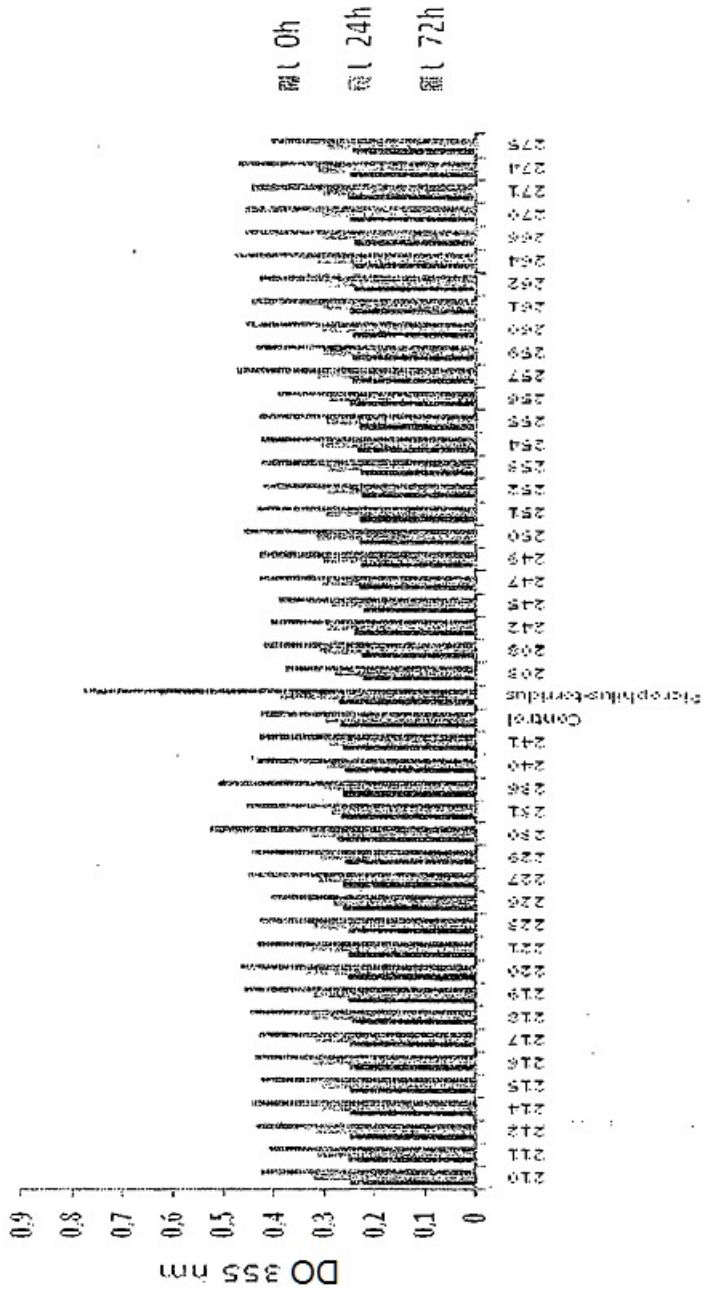


Figura 3

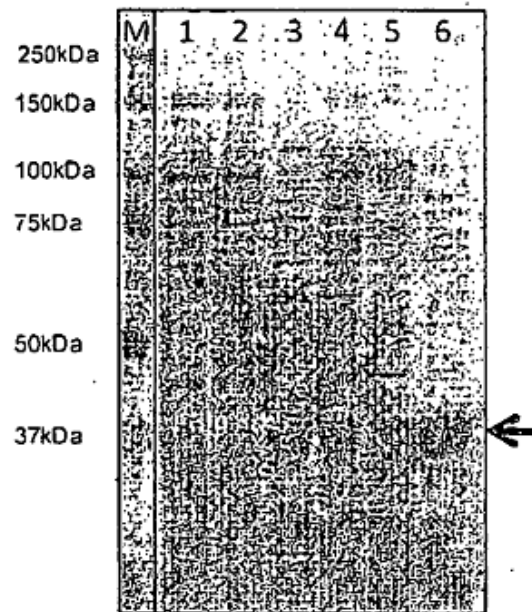


Figura 4a

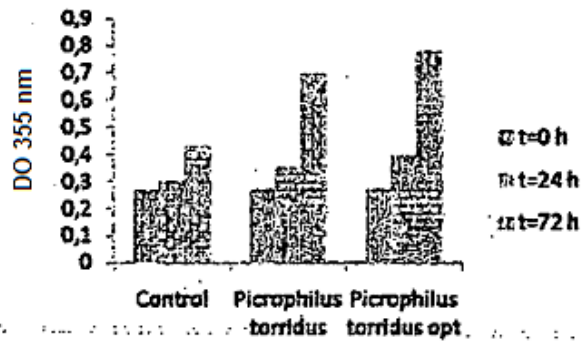


Figura 4b

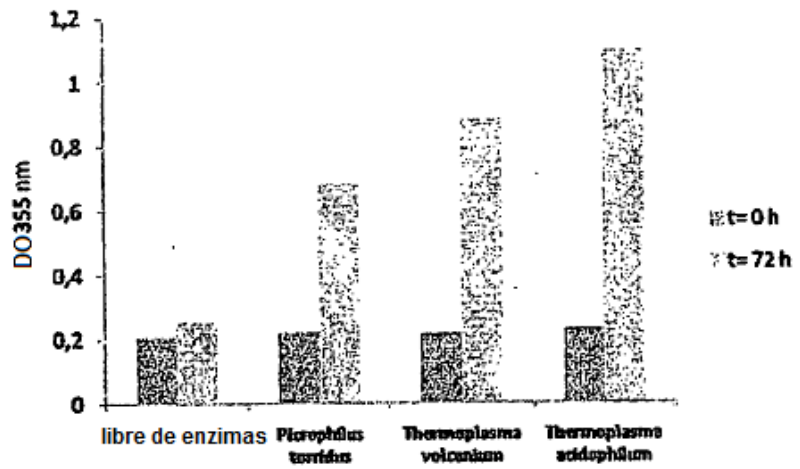


Figura 5

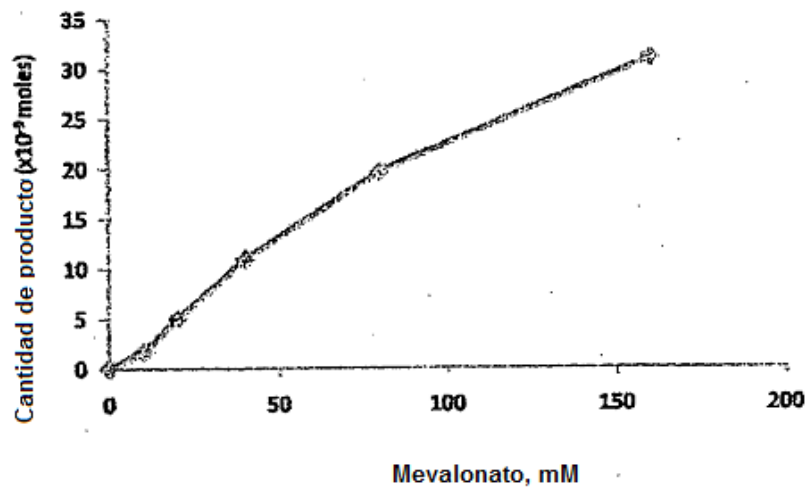


Figura 6

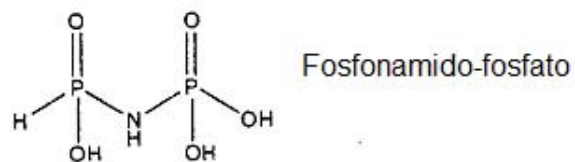
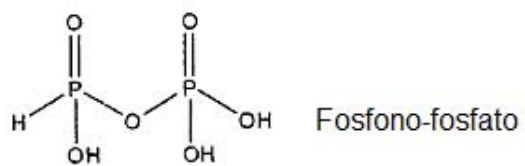


Figura 7