

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 865**

51 Int. Cl.:

C12P 5/02 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2013** **PCT/EP2013/067727**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014** **WO14033129**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2013** **E 13766909 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2890793**

54 Título: **Producción de dienos volátiles por deshidratación enzimática (EC 4.2.1.127) de alquenos ligeros**

30 Prioridad:

29.08.2012 EP 12182270

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

24.11.2017

73 Titular/es:

SCIENTIST OF FORTUNE S.A. (100.0%)

7a rue des Glacis

1628 Luxembourg, LU

72 Inventor/es:

MARLIÈRE, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 643 865 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

Producción de dienos volátiles por deshidratación enzimática (EC 4.2.1.127) de alquenoles ligeros

La presente invención se refiere a un procedimiento para generar dienos conjugados, C_nH_{2n-2} , con $3 < n < 7$, en particular dienos volátiles, a través de un proceso biológico. Más específicamente, la invención se refiere a un procedimiento para producir butadieno, isopreno o dimetilbutadieno a partir de alquenoles ligeros mediante deshidratación enzimática, en particular haciendo uso de una linalool deshidratasa-isomerasa (EC 4.2.1.127). Los dienos conjugados, por ejemplo, 1,3-dienos tales como butadieno o isopreno, son moléculas importantes para la industria. El isopreno (2-metil-1,3-butadieno) es un dieno conjugado de fórmula C_5H_8 . Es un compuesto clave para la industria de neumáticos, y también ha aplicaciones en los adhesivos. Se produce químicamente utilizando varias rutas:

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

El documento WO 2009/076676 informa de una ruta metabólica hacia el isopreno. La ruta se basa en la desfosforilación-deshidratación de los intermediarios aguas abajo en la ruta del mevalonato, es decir, isoprenil-pirofosfato o prenil-pirofosfato. Este proceso tiene el inconveniente de requerir el paso a través de toda la ruta de mevalonato: fosforilación doble de mevalonato, seguida de descarboxilación-deshidratación en isoprenil-pirofosfato, isomerizado adicionalmente en prenil-pirofosfato, y finalmente doble desfosforilación/deshidratación en isopreno. El butadieno (1,3-butadieno) es un dieno conjugado de fórmula C_4H_6 . Es un producto químico industrial importante utilizado como monómero en la producción de caucho sintético, nylon, ABS (Acrilonitrilo-butadieno-estireno), plásticos, látex. Existen diferentes posibilidades para producir butadieno. El butadieno se produce, por ejemplo, como producto del proceso de craqueo a vapor utilizado para producir etileno y otras olefinas.

En este proceso, el butadieno se produce en la corriente C4 y normalmente se aísla de otros subproductos por extracción en un disolvente aprótico polar, tal como acetonitrilo, del que se separa después. El butadieno también puede producirse por deshidrogenación catalítica de butano normal o puede producirse a partir de etanol. En este último caso, se utilizan dos procesos diferentes. En un procedimiento de una sola etapa, el etanol se convierte en butadieno, hidrógeno y agua a 400-450 °C sobre un catalizador de óxido metálico (Kirshenbaum, I. (1978), Butadiene. En M. Grayson (Ed.), Encyclopedia of Chemical Technology, 3ª ed., vol. 4, págs. 313-337. Nueva York: John Wiley & Sons). En un proceso en dos etapas, el etanol se oxida en acetaldehído que reacciona con etanol adicional sobre un catalizador de sílice poroso promovido por tantalio a 325-350 °C para producir butadieno (Kirshenbaum, I. (1978), loc cit.). El butadieno también puede producirse por deshidrogenación catalítica de los butenos normales.

Durante las últimas dos décadas, las tecnologías de ingeniería genética han hecho posible la modificación del metabolismo de los microorganismos y, por lo tanto, su uso para producir sustancias clave que de otro modo se producirían con un bajo rendimiento. Al mejorar las rutas metabólicas naturales, estas tecnologías abren nuevas formas de bio-producir numerosos compuestos de relevancia industrial. Varios compuestos industriales tales como los aminoácidos para la alimentación animal, plásticos biodegradables o fibras textiles se fabrican rutinariamente utilizando organismos genéticamente modificados. El documento WO 2013/082542 describe procedimientos para biosintetizar 1,3-butadieno formando dos grupos vinilo en un sustrato de síntesis de butadieno. Las rutas descritas se basan en enzimas tales como mevalonato difosfato descarboxilasa, isopreno sintasa y deshidratasa.

Todavía existe la necesidad de proporcionar procedimientos sencillos, rentables y respetuosos con el medio ambiente para producir los compuestos mencionados anteriormente.

La presente solicitud satisface esta necesidad proporcionando las realizaciones según se especifican en las reivindicaciones.

La presente invención se basa en el hallazgo de que las enzimas clasificadas como linalool deshidratasa-isomerasa (EC 4.2.1.127) como se describe, por ejemplo, en Brodkorb et al. (J. Biol. Chem. 285 (2010), 30436-30442) pueden catalizar la síntesis de compuestos dienos volátiles, en particular dienos conjugados tales como 1,3-dienos, basados en la conversión de alquenoles ligeros, en particular por deshidratación de alquenoles ligeros. Por lo tanto, la invención se basa en la demostración de que dicha conversión puede llevarse a cabo biológicamente utilizando una enzima que cataliza una reacción de deshidratación.

La invención se puede implementar *in vitro*, en sistemas libres de células, o utilizando organismos, en particular microorganismos. La invención se refiere también a la producción de dienos conjugados tales como 1,3-dienos a partir de una fuente de carbono, y particularmente un carbohidrato (en particular glucosa), un poliol (en particular glicerol), un polímero biodegradable (en particular almidón, celulosa, poli-3-hidroxialquenoato), convirtiéndose la fuente de carbono mediante un microorganismo en un alquenol ligero, que se convierte a continuación en un dieno conjugado tal como un 1,3-dieno.

Más específicamente, la invención se refiere a un procedimiento para producir un dieno conjugado caracterizado por que comprende una etapa de convertir enzimáticamente un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$ en $C_nH_{2n-2} + H_2O$, con $3 < n < 7$, haciendo uso de una linalool deshidratasa-isomerasa. La conversión es una deshidratación.

Un compuesto que responde a la fórmula $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$, se denomina en el contexto de la presente invención como un alquenol ligero.

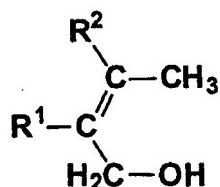
En una realización preferida, n es 4. En este caso, el alquenol ligero que se utilizará como sustrato en el procedimiento de acuerdo con la invención responde a la fórmula C_4H_8O . Los compuestos que responden a esta fórmula son but-2-en-1-ol (alcohol crotilico), but-3-en-2-ol y but-3-en-1-ol (alcohol isocrotilico). El dieno que resulta de la conversión de estos compuestos de acuerdo con el procedimiento de la presente invención es butadieno. En una realización particularmente preferida, el alquenol ligero usado como sustrato en el procedimiento de acuerdo con la invención es but-2-en-1-ol (alcohol crotilico) o but-3-en-2-ol y el dieno producido es butadieno.

En otra realización preferida, n es 5. En este caso, el alquenol ligero que se utilizará como sustrato en el procedimiento de acuerdo con la invención responde a la fórmula $C_5H_{10}O$. Los compuestos que responden a esta fórmula son 2-metilbut-2-en-1-ol, 3-metilbut-2-en-1-ol (prenol), 3-metilbut-3-en-2-ol, 2-metilbut-3-en-2-ol, 2-metilbut-3-en-1-ol y 3-metilbut-3-en-1-ol (isoprenol). El dieno que resulta de la conversión de estos compuestos de acuerdo con el procedimiento de la presente invención es isopreno. En una realización más preferida, el alquenol ligero usado como sustrato en el procedimiento de acuerdo con la invención es 2-metilbut-2-en-1-ol, 3-metilbut-2-en-1-ol (prenol), 3-metilbut-3-en-2-ol, 2-metilbut-3-en-2-ol, o 3-metilbut-3-en-1-ol (isoprenol) y el dieno producido es isopreno. En una realización más preferida, el alquenol ligero usado como sustrato en el procedimiento de acuerdo con la invención es 3-metilbut-2-en-1-ol (prenol), 3-metilbut-3-en-2-ol, 2-metilbut-3-en-2-ol, o 3-metilbut-3-en-1-ol (isoprenol) y el dieno producido es isopreno. En una realización particularmente preferida, el alquenol ligero usado como sustrato en el procedimiento de acuerdo con la invención es 3-metilbut-2-en-1-ol (prenol) o 2-metilbut-3-en-2-ol y el dieno producido es isopreno.

En otra realización preferida, n es 6. En este caso, el alquenol ligero que se utilizará como sustrato en el procedimiento de acuerdo con la invención responde a la fórmula $C_6H_{12}O$. Los compuestos que responden a esta fórmula son 2,3-dimetilbut-2-en-1-ol, 2,3-dimetilbut-3-en-2-ol y 2,3-dimetilbut-3-en-1-ol. El dieno que resulta de la conversión de estos compuestos de acuerdo con el procedimiento de la presente invención es dimetil-butadieno. En una realización particularmente preferida, el alquenol ligero usado como sustrato en el procedimiento de acuerdo con la invención es 2,3-dimetilbut-2-en-1-ol o 2,3-dimetilbut-3-en-2-ol y el dieno producido es dimetil-butadieno.

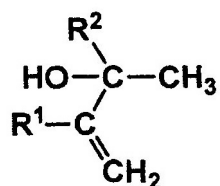
Los compuestos que responden a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$, pueden subdividirse en tres grupos, concretamente en

(i) alcoholes alílicos primarios (PRA) de fórmula I:



Fórmula I

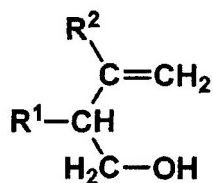
(ii) alcoholes alílicos secundarios o terciarios (STA) de fórmula II:



Fórmula II

y

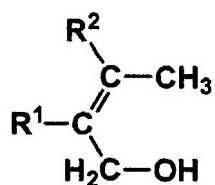
(iii) alcoholes homoalílicos primarios (PHA) de fórmula III:



Fórmula III

5 en la que R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de H y CH_3 .

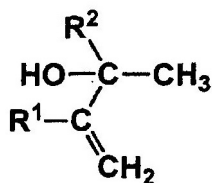
En una realización preferida, el compuesto que responde a la fórmula general $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}$, con $3 < n < 7$, es un alcohol alílico primario (PRA) de fórmula I:



Fórmula I

10 en la que R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de H y CH_3 . Los compuestos que responden a esta fórmula son but-2-en-1-ol (alcohol crotilico), 2-metilbut-2-en-1-ol, 3-metilbut-2-en-1-ol (prenol) y 2,3-dimetilbut-2-en-1-ol (véase la Figura 1). En una realización preferida, el alcohol alílico primario es but-2-en-1-ol (alcohol crotilico) y el dieno producido es butadieno. En otra realización preferida, el alcohol alílico primario es 3-metilbut-2-en-1-ol (prenol) y el dieno producido es isopreno.

15 En otra realización preferida, el compuesto que responde a la fórmula general $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}$, con $3 < n < 7$, es un alcohol alílico secundario o terciario (STA) de fórmula II:

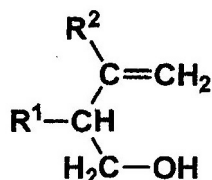


Fórmula II

en la que R¹ y R² se seleccionan independientemente de H y CH₃. Los compuestos que responden a esta fórmula son but-3-en-2-ol, 3-metilbut-3-en-2-ol, 2-metilbut-3-en-2-ol y 2,3-dimetilbut-3-en-2-ol (véase la Figura 2).

5 En una realización preferida, el STA es but-3-en-2-ol y el dieno producido es butadieno. En otra realización preferida, el STA es 2-metilbut-3-en-2-ol y el dieno producido es isopreno.

En una realización preferida adicional, el compuesto que responde a la fórmula general C_nH_{2n}O, con 3 < n < 7, es un alcohol homoalílico primario (PHA) de fórmula III:



Fórmula III

10 en la que R¹ y R² se seleccionan independientemente de H y CH₃. Los compuestos que responden a esta fórmula son but-3-en-1-ol (isoalcohol crotilico), 2-metilbut-3-en-1-ol, 3-metilbut-3-en-1-ol (isoprenol) y 2,3-dimetilbut-3-en-1-ol (véase la Figura 3).

En una realización preferida, el alcohol homoalílico es 3-metilbut-3-en-1-ol (isoprenol) y el dieno producido es isopreno.

15 La Figura 4 proporciona una visión general esquemática de la conversión de los compuestos PRA, PHA y STA mencionados anteriormente en un dieno conjugado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.

Si se hace referencia en el contexto de la presente invención a un compuesto del cual existen estereoisómeros, por ejemplo, debido a las inversiones Z/E en los enlaces dobles sp² C=C o debido a las inversiones R/S en los centros quirales sp³ C, todos estos estereoisómeros están incluidos por referencia a tal compuesto. Por ejemplo, la mención de but-2-en-1-ol (alcohol crotilico) se refiere al cis (Z), así como al estereoisómero trans (E). De manera similar, la mención de 2-metilbut-2-en-1-ol se refiere al cis (Z), así como al estereoisómero trans (E). Además, la mención de but-3-en-2-ol, de 3-metilbut-3-en-2-ol, de 2-metilbut-3-en-1-ol o de 2,3-dimetilbut-3-en-1-ol se refiere al isómero tanto R como S.

25 En una realización preferida, la mención de but-2-en-1-ol (alcohol crotilico) se refiere al estereoisómero cis (Z). En otra realización preferida, la mención de but-2-en-1-ol (alcohol crotilico) se refiere al estereoisómero trans (E). En otra realización, la mención de but-2-en-1-ol (alcohol crotilico) se refiere a una mezcla que comprende ambos estereoisómeros. Si cualquiera de estos se usa como un sustrato en el procedimiento de acuerdo con la invención el producto es butadieno.

30 En una realización preferida, la mención de 2-metilbut-2-en-1-ol se refiere al estereoisómero cis (Z). En otra realización preferida, la mención de 2-metilbut-2-en-1-ol se refiere al estereoisómero trans (E). En otra realización, la mención de but-2-metilbut-2-en-1-ol se refiere a una mezcla que comprende ambos estereoisómeros. Si cualquiera de estos se usa como un sustrato en el procedimiento de acuerdo con la invención el producto es isopreno.

35 En una realización preferida, la mención de but-3-en-2-ol se refiere al isómero R. En otra realización preferida, la mención de but-3-en-2-ol se refiere al isómero S. En otra realización, la mención de but-3-en-2-ol se refiere a una mezcla que comprende ambos isómeros. Si cualquiera de estos se usa como un sustrato en el procedimiento de acuerdo con la invención el producto es butadieno.

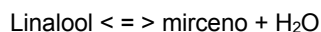
En una realización preferida, la mención de 3-metilbut-3-en-2-ol se refiere al isómero R. En otra realización preferida,

la mención de 3-metilbut-3-en-2-ol se refiere al isómero S. En otra realización, la mención de 3-metilbut-3-en-2-ol se refiere a una mezcla que comprende ambos isómeros. Si cualquiera de estos se usa como un sustrato en el procedimiento de acuerdo con la invención el producto es isopreno.

5 En una realización preferida, la mención de 2-metilbut-3-en-1-ol se refiere al isómero R. En otra realización preferida, la mención de 2-metilbut-3-en-1-ol se refiere al isómero S. En otra realización, la mención de 2-metilbut-3-en-1-ol se refiere a una mezcla que comprende ambos isómeros. Si cualquiera de estos se usa como un sustrato en el procedimiento de acuerdo con la invención el producto es isopreno.

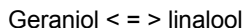
10 En una realización preferida, la mención de 2,3-dimetilbut-3-en-1-ol se refiere al isómero R. En otra realización preferida, la mención de 2,3-dimetilbut-3-en-1-ol se refiere al isómero S. En otra realización, la mención de 2,3-dimetilbut-3-en-1-ol se refiere a una mezcla que comprende ambos isómeros. Si cualquiera de estos se usa como un sustrato en el procedimiento de acuerdo con la invención el producto es dimetil-butadieno.

15 Como se ha descrito anteriormente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención está caracterizado por que la conversión del compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$ en $C_nH_{2n-2} + H_2O$, con $3 < n < 7$, se logra utilizando una linalool deshidratasa-isomerasa (EC 4.2.1.127). Se ha demostrado que dicha enzima puede deshidratar compuestos que responden a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$, en la que el producto de la reacción es $C_nH_{2n-2} + H_2O$. Esta actividad se puede medir en ensayos como se describe en los Ejemplos adjuntos. Un ejemplo de una linalool deshidratasa-isomerasa (EC 4.2.1.127) a emplear en un procedimiento según la presente invención es la linalool deshidratasa-isomerasa (EC 4.2.1.127) que ha sido identificada en la cepa de *Castellaniella defragrans* (anteriormente *Alcaligenes defragrans*) 65Phen (Brodkorb et al., J. Biol. Chem. 285 (2010), 30436-30442). La linalool deshidratasa-isomerasa es una enzima bifuncional que está implicada en la degradación anaerobia de monoterpenos. Se ha descubierto que la enzima nativa tiene una masa molecular de 160 kDa y se supone que es un homotetrámero de 40 kDa subunidades. La enzima cataliza *in vitro* dos reacciones en ambas direcciones dependiendo de las fuerzas motrices termodinámicas. Por un lado, la enzima cataliza la isomerización del alcohol alílico primario geraniol en su estereoisómero linalool que tiene un motivo de alcohol alílico terciario. Por otra parte, la enzima cataliza la secesión del agua (deshidratación) del alcohol terciario linalool al correspondiente monoterpeno acíclico beta-mirceno, una molécula que lleva un motivo de dieno conjugado. La Figura 5 da una visión general de las reacciones catalizadas por linalool deshidratasa-isomerasa *in vitro* en condiciones anaerobias. En *Castellaniella defragrans* la proteína se expresa como una proteína precursora con un péptido señal para una localización periplásmica que se escinde después del transporte a través de la membrana. La enzima se clasifica como EC 4.2.1.127. Una linalool deshidratasa-isomerasa tiene la capacidad de catalizar la siguiente reacción en condiciones anaerobias:



35 Esta actividad puede medirse, por ejemplo, con un ensayo como se describe en Brodkorb et al. (loc. cit.). En dicho ensayo, los viales se calientan previamente a 35 °C, se transfiere una solución de proteína anóxica a los viales y se añade DTT a 2 mM. Las mezclas de reacción se sellan con un tapón de butilo y el espacio superior se purga con CO_2/N_2 (10/90 (v/v)). La reacción se inicia añadiendo una concentración distinta de linalool y se incuba a 35 °C. La conversión de linalool en mirceno se evalúa investigando la producción de mirceno, por ejemplo, por cromatografía de gases.

40 En una realización preferida, una linalool deshidratasa-isomerasa también tiene la capacidad de catalizar la isomerización de geraniol en linalool en condiciones anaerobias:



45 Esta actividad puede medirse, por ejemplo, con un ensayo como se describe en Brodkorb et al. (loc. cit.). En dicho ensayo, los viales se calientan previamente a 35 °C, se transfiere una solución de proteína anóxica a los viales y se añade DTT a 2 mM. Las mezclas de reacción se sellan con un tapón de butilo y el espacio superior se purga con CO_2/N_2 (10/90 (v/v)). La reacción se inicia añadiendo una concentración distinta de geraniol y se incuba a 35 °C. La conversión de geraniol en linalool se evalúa investigando la producción de mirceno, es decir, el producto de la segunda realización catalizada por la enzima, por ejemplo, por cromatografía de gases.

50 El geraniol, el linalool y el mirceno son terpenoides C_{10} acíclicos producidos por plantas, pertenecientes a la clase de alcoholes alifáticos e hidrocarburos, respectivamente. Lüddecke y Harder (Z. Naturforsch. 66c (2011), 409-412) informaron sobre una alta especificidad de sustrato de linalool deshidratasa-isomerasa. Los inventores encontraron ahora sorprendentemente que la linalool deshidratasa-isomerasa puede actuar sobre compuestos de fórmula $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$, y puede convertirlos en dienos conjugados. En los ejemplos adjuntos se muestra esto para la conversión de but-2-en-1-ol (alcohol crotilico) en butadieno, de but-3-en-2-ol en butadieno, de 3-metilbut-2-en-1-ol (prenol) en isopreno, de 3-metilbut-3-en-1-ol (isoprenol) en isopreno y de 2-metilbut-3-en-2-ol en isopreno. Por lo tanto, los presentes inventores podrían demostrar que la linalool deshidratasa-isomerasa puede convertir inesperadamente también alquenos que son mucho más cortos que sus sustratos naturales a pesar de la alta especificidad de sustrato descrita. Por lo tanto, la enzima empleada en el procedimiento de acuerdo con la presente invención es una linalool deshidratasa (EC 4.2.1.127).

Un ejemplo de una secuencia de una linalool deshidratasa-isomerasa (EC 4.2.1.127) que se puede emplear en el procedimiento de acuerdo con la presente invención se da en la SEQ ID NO: 1 (Figura 6). También se puede acceder a una secuencia para una linalool deshidratasa-isomerasa también en la base de datos UniProtKB/TrEMBL bajo el número de acceso E1XUJ2. En una realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la presente invención hace uso de una linalool deshidratasa-isomerasa que comprende la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que es al menos un x % idéntica a la SEQ ID NO: 1 y que es capaz de catalizar la conversión de un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$ en $C_nH_{2n-2} + H_2O$, con $3 < n < 7$, siendo x un número entero entre 60 y 100, preferentemente 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99.

El término "linalool deshidratasa-isomerasa", como se utiliza en la presente invención, se refiere preferentemente, por lo tanto, a una enzima que muestra el grado de identidad de secuencia indicado anteriormente con SEQ ID NO: 1 y que puede catalizar la conversión de un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$ en $C_nH_{2n-2} + H_2O$, con $3 < n < 7$. Usando la secuencia de SEQ ID NO: 1 o secuencias de nucleótidos codificantes correspondientes, es posible que el experto en la técnica identifique linalool deshidratasa-isomerasas que pueden catalizar la conversión indicada anteriormente.

Dichas variantes de una linalool deshidratasa (EC 4.2.1.127), también incluyen versiones acortadas que muestran delecciones en el extremo N o C, preferentemente en el extremo C, como se describe más adelante. Los Ejemplos adjuntos muestran que tales versiones truncadas mantienen la capacidad para catalizar las conversiones descritas anteriormente.

Preferentemente, el grado de identidad se determina comparando la secuencia respectiva con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Cuando las secuencias que se comparan no tienen la misma longitud, el grado de identidad preferentemente se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia más corta que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia más larga o al porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia más larga que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia más corta. El grado de identidad de secuencia se puede determinar de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica usando preferentemente algoritmos informáticos adecuados tales como CLUSTAL.

Cuando se utiliza el procedimiento de análisis de Clustal para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, un 80 % idéntica a una secuencia de referencia, se pueden usar los ajustes por defecto o los ajustes son preferentemente los siguientes: Matriz: blosum 30; Penalización por huecos abiertos: 10,0; Aumento de penalización por huecos: 0,05; Retardo divergente: 40; Distancia de separación entre huecos: 8 para comparaciones de secuencias aminoacídicas. Para las comparaciones de secuencias de nucleótidos, el aumento de penalización por huecos se ajusta preferentemente a 5,0.

Preferentemente, el grado de identidad se calcula sobre toda la longitud de la secuencia.

Además, si se usa el término "homología" en el contexto de la presente invención, este término significa preferentemente "identidad de secuencia".

Como se ha descrito anteriormente, la "linalool deshidratasa-isomerasa" identificada en *Castellaniella defragrans* (anteriormente *Alcaligenes defragrans*) tiene un péptido señal que asegura el transporte en el espacio periplasmático. En una realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la presente invención emplea una enzima que no muestra dicha secuencia señal. Se muestra en los Ejemplos que la interrupción del péptido señal por inserción de una etiqueta his no obstaculiza la expresión de la enzima en *E. coli* y conduce a la producción intracelular de una proteína activa.

La linalool deshidratasa-isomerasa empleada en el procedimiento de acuerdo con la invención puede ser una linalool deshidratasa-isomerasa de origen natural o puede ser una linalool deshidratasa-isomerasa que se obtiene a partir de una linalool deshidratasa-isomerasa natural, por ejemplo, por la introducción de mutaciones u otras alteraciones que, por ejemplo, alteran o mejoran la actividad enzimática, la estabilidad, en particular la estabilidad térmica, etc.

Los Ejemplos adjuntos muestran que también las versiones truncadas de una linalool deshidratasa (EC 4.2.1.127) pueden catalizar eficientemente las conversiones descritas anteriormente, preferentemente versiones truncadas que muestran delecciones en el extremo C-terminal. Por lo tanto, la expresión "alquenol deshidratasa" también incluye enzimas que se obtienen a partir de una alquenol deshidratasa, tal como una linalool deshidratasa (EC 4.2.1.127) por delecciones, en particular delecciones en el extremo C-terminal. Más preferentemente, es una enzima que se obtiene a partir de una enzima que muestra la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO: 1 por delección de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 residuos aminoacídicos del extremo C-terminal.

La expresión "linalool deshidratasa-isomerasa" o "una proteína/enzima que tiene la actividad de una linalool deshidratasa-isomerasa" en el contexto de la presente solicitud también incluye enzimas que se obtienen a partir de una linalool deshidratasa-isomerasa, que son capaces de catalizar la conversión de un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$ en $C_nH_{2n-2} + H_2O$, con $3 < n < 7$, pero que sólo tienen una baja afinidad con sus sustratos naturales, es decir, geraniol, linalool y/o mirceno, con la condición de que aún pertenezcan a la clase EC 4.2.1.127.

Tal modificación del sustrato preferido permite mejorar la conversión de un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$ en $C_nH_{2n-2} + H_2O$, con $3 < n < 7$, y reducir la producción de subproductos no deseados que puedan aparecer. Los procedimientos para modificar y/o mejorar las actividades enzimáticas deseadas de las proteínas se conocen bien por el experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida al sitio y la selección posterior de enzimas que tienen las propiedades o enfoques deseados de la denominada "evolución dirigida", el barajado del ADN o la evolución *in vivo*.

Por ejemplo, para la ingeniería genética en células procariotas, se puede introducir una molécula de ácido nucleico que codifica una linalool deshidratasa-isomerasa en plásmidos que permiten la mutagénesis o modificación de secuencias por recombinación de secuencias de ADN. Los procedimientos estándares (véanse Sambrook y Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, Estados Unidos) permiten realizar intercambios de bases o añadir secuencias naturales o sintéticas. Los fragmentos de ADN pueden conectarse entre sí aplicando adaptadores y enlazadores a los fragmentos. Además, se pueden usar medidas de ingeniería que proporcionen sitios de restricción adecuados o eliminen el exceso de ADN o sitios de restricción. En aquellos casos en los que son posibles inserciones, supresiones o sustituciones, se puede usar mutagénesis *in vitro*, "reparación de cebador", restricción o ligadura. En general, se realizan análisis de secuencias, análisis de restricción y otros procedimientos de bioquímica y biología molecular como procedimientos de análisis. Las variantes de linalool deshidratasa-isomerasa resultantes se ensayan a continuación en cuanto a su actividad enzimática y en particular por su capacidad de preferir un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$, como sustrato en lugar de, por ejemplo, geraniol, linalool y/o mirceno.

Dichos procedimientos para identificar variantes con propiedades enzimáticas mejoradas con respecto a la producción de un compuesto de dieno conjugado también pueden realizarse en presencia de un cofactor que permite una complementación estérica y/o electrónica en el sitio catalítico de la enzima debida al hecho de que el compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$, es más corto que los sustratos naturales.

En una realización preferida, la linalool deshidratasa-isomerasa empleada en un procedimiento de acuerdo con la invención muestra una alta estabilidad térmica. Dicha enzima se puede obtener por procedimientos rutinarios que incluyen, por ejemplo, mutación aleatoria de una secuencia de ácido nucleico que codifica una linalool deshidratasa-isomerasa y cribado de los mutantes obtenidos para una mayor estabilidad térmica. Preferentemente, la linalool deshidratasa-isomerasa es estable y enzimáticamente activa a temperaturas de 68 °C o superiores. Dado que el punto de ebullición del dimetilbutadieno es de 68 °C a presión atmosférica, el uso de tal enzima y la realización del procedimiento según la invención a una temperatura de 68 °C o superior tiene la ventaja de que el dimetilbutadieno desgasifica la reacción y puede fácilmente recuperarse de la fase gaseosa.

La versión modificada de la linalool deshidratasa-isomerasa, por ejemplo, una variante que acepta o prefiere un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$, como sustrato pero que tiene una afinidad baja con sus sustratos naturales o una variante con una estabilidad térmica más alta, puede obtenerse a partir de un linalool deshidratasa-isomerasa natural o de una linalool deshidratasa-isomerasa ya modificada, optimizada o preparada sintéticamente.

El procedimiento de acuerdo con la invención puede realizarse *in vitro*, por ejemplo, en presencia de una enzima aislada o de lisados celulares que comprenden la enzima o preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas. *In vitro* significa preferentemente en un sistema libre de células. En una realización, la enzima empleada en el procedimiento se usa en forma purificada para convertir un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$ en $C_nH_{2n-2} + H_2O$, con $3 < n < 7$. Sin embargo, tal procedimiento puede ser costoso, puesto que la enzima y los costes de producción y purificación de sustratos son altos. Por lo tanto, en otra realización preferida, las enzimas empleadas en el procedimiento están presentes en la reacción como un extracto no purificado, o bien en forma de bacterias no lisadas, con el fin de economizar los costes de purificación de proteínas. Sin embargo, los costes asociados con dicho procedimiento pueden ser todavía bastante elevados debido a los costes de producción y purificación de los sustratos.

En una reacción *in vitro*, las enzimas, nativas o recombinantes, purificadas o no, se incuban en presencia del sustrato en condiciones fisicoquímicas que permiten que las enzimas sean activas, y se deja que la incubación prosiga durante un periodo de tiempo suficiente, permitiendo la producción del dieno. Al final de la incubación, se mide opcionalmente la presencia del compuesto dieno usando cualquier sistema de detección conocido por un experto en la técnica, tal como cromatografía de gases o pruebas colorimétricas para medir la formación de tales compuestos.

En una realización particularmente preferida de la invención, el procedimiento se realiza *in vitro* y la enzima se inmoviliza. Los medios y procedimientos para inmovilizar enzimas en diferentes soportes se conocen bien por el experto en la técnica.

En otra realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo en cultivo, en presencia de un organismo, preferentemente un microorganismo, que produce la enzima. Por lo tanto, en tal realización de la invención, se utiliza un organismo, preferentemente un microorganismo, que produce una linalool deshidratasa-isomerasa. En una realización preferida, el (micro)organismo es recombinante porque la enzima producida por el

huésped es heteróloga con respecto al huésped de producción. Por lo tanto, el procedimiento puede realizarse directamente en el medio de cultivo, sin necesidad de separar o purificar las enzimas. De una manera especialmente ventajosa, se utiliza un (micro)organismo que tiene la propiedad natural o artificial de producir endógenamente un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$, y que también expresa o sobreexpresa una linalool deshidratasa-isomerasa natural o modificada, para producir el compuesto de dieno directamente a partir de una fuente de carbono presente en solución.

Por ejemplo, el procedimiento de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo utilizando microorganismos que producen un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$. Por ejemplo, Perez et al. (Phytochemistry 19 (1980), 183-187) describen enzimas de *Citrus sinensis* que son capaces de hidrolizar fosfatos alílicos, por ejemplo, una prenil difosfatasa (EC 3.1.7.1) que puede convertir difosfato de prenil en prenil y difosfato. Las secuencias de ácido nucleico que codifican tales enzimas se pueden introducir en microorganismos que producen el sustrato correspondiente para poder producir prenil. Además, Withers et al. (Appl. Environ. Microbiol. 73 (2007), 6277-6283) han descrito, por ejemplo, células de *E. coli* que han sido diseñadas con la ruta biosintética de pirofosfato de isopentenilo a base de mevalonato y que también expresan el gen nudF de la cepa *Bacillus subtilis* 6.051. La proteína codificada por el gen nudF actúa directamente sobre los precursores difosfato de prenil y conduce a la producción de isopentenol (isoprenol).

Por lo tanto, en una realización del procedimiento de acuerdo con la presente invención, se prefiere utilizar un microorganismo que sea capaz de producir un compuesto que responda a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$, y que haya sido diseñado genéticamente de tal forma que (sobre)expresa una linalool deshidratasa-isomerasa, originándose dicha linalool deshidratasa-isomerasa preferentemente de un organismo diferente del microorganismo huésped. La modificación genética puede consistir, por ejemplo, en la integración del gen correspondiente que codifica la linalool deshidratasa-isomerasa en el cromosoma, que expresa la enzima a partir de un plásmido que contiene un promotor aguas arriba de la secuencia codificante de enzimas, produciendo el promotor y la secuencia codificante preferentemente de diferentes organismos, o cualquier otro procedimiento conocido por un experto en la técnica. Alternativamente, otras bacterias o levaduras pueden tener ventajas específicas y pueden ser elegidas. Por ejemplo, puede usarse una levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae*, una bacteria extremófila tal como *Thermus thermophilus*, o bacterias anaerobias de la familia Clostridiaceae, microalgas o bacterias fotosintéticas.

También es posible aislar los genes que codifican las proteínas que son responsables de la síntesis de un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$, e introducir estos genes en otros organismos, en particular un microorganismo, tal como, por ejemplo, *E. coli*, *Saccharomyces* o *Pichia*, una bacteria extremófila tal como *Thermus thermophilus*, o bacterias anaerobias de la familia Clostridiaceae, microalgas o bacterias fotosintéticas.

En una realización preferida, el (micro)organismo utilizado en el procedimiento de acuerdo con la invención es un (micro)organismo que se modifica genéticamente para contener una molécula de ácido nucleico que codifica una linalool deshidratasa isomerasa. Tal molécula de ácido nucleico que codifica una linalool deshidratasa-isomerasa como se ha descrito anteriormente se puede usar en solitario o como parte de un vector. Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender además secuencias de control de expresión unidas operativamente al polinucleótido comprendido en la molécula de ácido nucleico. La expresión "unida operativamente", como se utiliza a lo largo de la presente descripción, se refiere a un enlace entre una o más secuencias de control de expresión y la región codificante en el polinucleótido para expresarse de tal manera que la expresión se logra en condiciones compatibles con la secuencia de control de expresión.

La expresión comprende la transcripción de la secuencia de ADN heteróloga, preferentemente en un ARNm traducible. Los elementos reguladores que aseguran la expresión en hongos, así como en bacterias, se conocen bien por los expertos en la técnica. Incluyen promotores, potenciadores, señales de terminación, señales de direccionamiento, y similares. A continuación, se proporcionan ejemplos en relación con las explicaciones relativas a los vectores.

Los promotores para su uso en relación con la molécula de ácido nucleico pueden ser homólogos o heterólogos con respecto a su origen y/o con respecto al gen a expresar. Los promotores adecuados son, por ejemplo, promotores que se prestan a la expresión constitutiva. Sin embargo, también se pueden usar promotores que sólo se activan en un momento determinado por influencias externas. En este contexto pueden utilizarse promotores artificiales y/o químicamente inducibles.

Los vectores pueden comprender además secuencias de control de expresión ligadas operativamente a dichos polinucleótidos contenidos en los vectores. Estas secuencias de control de expresión pueden ser adecuadas para asegurar la transcripción y síntesis de un ARN traducible en bacterias u hongos.

Además, es posible insertar diferentes mutaciones en los polinucleótidos por procedimientos habituales en la biología molecular (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, Estados Unidos), que conduce a la síntesis de polipéptidos que posiblemente tienen propiedades biológicas modificadas. La introducción de mutaciones puntuales es concebible en posiciones en las que una modificación de la secuencia de aminoácidos influye, por ejemplo, en la actividad biológica o la regulación del polipéptido.

Además, pueden prepararse mutantes que poseen un sustrato modificado o especificidad del producto. Preferentemente, dichos mutantes muestran una actividad aumentada. Además, la introducción de mutaciones en los polinucleótidos que codifican una enzima como se definió anteriormente permite que la velocidad de expresión génica y/o la actividad de las enzimas codificadas por dichos polinucleótidos se optimicen, por ejemplo, en lo que respecta a la estabilidad térmica.

Para modificar genéticamente bacterias u hongos, los polinucleótidos que codifican una enzima como se ha definido anteriormente o partes de estas moléculas pueden introducirse en plásmidos que permitan la mutagénesis o la modificación de secuencia por recombinación de secuencias de ADN. Los procedimientos estándares (véanse Sambrook y Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) permiten realizar intercambios de bases o añadir secuencias naturales o sintéticas. Los fragmentos de ADN pueden conectarse entre sí aplicando adaptadores y enlazadores a los fragmentos. Además, se pueden usar medidas de ingeniería que proporcionen sitios de restricción adecuados o eliminan el exceso de ADN o sitios de restricción. En aquellos casos en los que son posibles inserciones, supresiones o sustituciones, se puede usar mutagénesis *in vitro*, "reparación de cebador", restricción o ligadura. En general, se realizan análisis de secuencias, análisis de restricción y otros procedimientos de bioquímica y biología molecular como procedimientos de análisis.

El polinucleótido introducido en un (micro)organismo se expresa para conducir a la producción de un polipéptido que tiene la actividad descrita anteriormente. Una descripción general de diferentes sistemas de expresión está contenida, por ejemplo, en *Methods in Enzymology* 153 (1987), 385-516, en Bitter et al. (*Methods in Enzymology* 153 (1987), 516-544) y en Sawers et al. (*Applied Microbiology and Biotechnology* 46 (1996), 1-9), Billman-Jacobe (*Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 500-4), Hockney (*Trends in Biotechnology* 12 (1994), 456-463), Griffiths et al., (*Methods in Molecular Biology* 75 (1997), 427-440). Se da una visión general de los sistemas de expresión de levaduras, por ejemplo, por Hensing et al. (*Antonie van Leeuwenhoek* 67 (1995), 261-279), Bussineau et al. (*Developments in Biological Standardization* 83 (1994), 13-19), Gellissen et al. (*Antonie van Leeuwenhoek* 62 (1992), 79-93), Fleer (*Current Opinion in Biotechnology* 3 (1992), 486-496), Vedvick (*Current Opinion in Biotechnology* 2 (1991), 742-745) y Buckholz (*Bio/Technology* 9 (1991), 1067-1072).

Los vectores de expresión han sido ampliamente descritos en la bibliografía. Por regla general, contienen no sólo un gen marcador de selección y un origen de replicación que garantiza la replicación en el huésped seleccionado, sino también un promotor bacteriano o vírico y, en la mayoría de los casos, una señal de terminación para la transcripción. Entre el promotor y la señal de terminación hay en general al menos un sitio de restricción o un polienlazador que permite la inserción de una secuencia de ADN codificante. La secuencia de ADN que controla naturalmente la transcripción del gen correspondiente puede usarse como la secuencia promotora, si está activa en el organismo huésped seleccionado. Sin embargo, esta secuencia también se puede intercambiar por otras secuencias promotoras. Es posible utilizar promotores que aseguren la expresión constitutiva del gen y promotores inducibles que permitan un control deliberado de la expresión del gen. Las secuencias promotoras bacterianas y víricas que poseen estas propiedades se describen en detalle en la bibliografía. Las secuencias reguladoras de la expresión en microorganismos (por ejemplo, *E. coli*, *S. cerevisiae*) se describen suficientemente en la bibliografía. Los promotores que permiten una expresión particularmente alta de una secuencia aguas abajo son, por ejemplo, el promotor T7 (Studier et al., *Methods in Enzymology* 185 (1990), 60-89), lacUV5, trp, trp-lacUV5 (DeBoer et al., en Rodríguez y Chamberlin (Eds), *Promoters, Structure and Function*; Praeger, Nueva York, (1982), 462-481; DeBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983), 21-25), Ip1, rac (Boros et al., *Gene* 42 (1986), 97-100). Los promotores inducibles se utilizan preferentemente para la síntesis de polipéptidos. Estos promotores a menudo conducen a mayores rendimientos de polipéptidos que los promotores constitutivos. Con el fin de obtener una cantidad óptima de polipéptido, a menudo se utiliza un proceso de dos fases. En primer lugar, las células huésped se cultivan en condiciones óptimas hasta una densidad celular relativamente alta. En la segunda etapa, la transcripción se induce dependiendo del tipo de promotor utilizado. A este respecto, un promotor tac es particularmente adecuado que puede inducirse por lactosa o IPTG (=isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) (deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983), 21-25). Las señales de terminación para la transcripción también se describen en la bibliografía.

La región de codificación que codifica la linalool deshidratasa-isomerasa puede ser modificada de manera conocida por el experto en la técnica. Por ejemplo, es posible insertar etiquetas que simplifiquen la purificación de la proteína tal como una etiqueta his (véase el Ejemplo 1). Además, también es posible suprimir o interrumpir la secuencia señal de la enzima que asegura la localización en el periplasma permitiendo así que la proteína se produzca intracelularmente. También es posible unir a la región codificante una señal de secreción que permita la secreción de la proteína en el medio de cultivo.

También es posible expresar la linalool deshidratasa-isomerasa como una proteína de fusión en la que la linalool deshidratasa-isomerasa está fusionada a otro resto polipeptídico, por ejemplo, otra enzima.

La transformación de la célula huésped con un polinucleótido o vector de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo por procedimientos estándar, como se describe, por ejemplo, en Sambrook y Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, Estados Unidos; *Methods in Yeast Genetics*, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990. La célula huésped se cultiva en medio nutritivo que cumple los requisitos de la célula huésped particular usada, en particular con respecto al valor de pH, temperatura, concentración de sal, aireación, antibióticos, vitaminas, oligoelementos, etc.

Los organismos utilizados en la invención que expresan una linalool deshidratasa-isomerasa como se ha descrito anteriormente en el presente documento pueden ser procariotas o eucariotas, preferentemente son microorganismos. El término "microorganismo" en el contexto de la presente invención se refiere a bacterias, así como a hongos, tales como levaduras, y también a algas y arqueas. El término "microorganismo" también incluye células vegetales o células animales. En una realización particular, los microorganismos son bacterias. Las bacterias preferidas a emplear en el procedimiento de acuerdo con la invención son bacterias del género *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Zymomonas*, *Methylobacter* o *Escherichia*. En una realización particularmente preferida, la bacteria pertenece al género *Escherichia* y aún más preferida es *Escherichia coli*. En otra realización preferida, la bacteria pertenece a la especie *Pseudomonas putida* o a la especie *Zymomonas mobilis* o a la especie *Corynebacterium glutamicum*.

En otra realización preferida, los microorganismos son bacterias recombinantes, preferentemente del género *Escherichia*, después de haber sido modificados con el fin de producir endógenamente un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$, y convertirlo en un dieno como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

El término "microorganismo" en el contexto de la presente invención se refiere a bacterias, así como a hongos, tales como levaduras, y también a algas y arqueas. En una realización preferida, el microorganismo es una bacteria. En principio se puede utilizar cualquier bacteria. Las bacterias preferidas a emplear en el procedimiento de acuerdo con la invención son bacterias del género *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Zymomonas*, o *Escherichia*. En una realización particularmente preferida, la bacteria pertenece al género *Escherichia* y aún más preferida es *Escherichia coli*. En otra realización preferida, la bacteria pertenece a la especie *Pseudomonas putida* o a la especie *Zymomonas mobilis* o a la especie *Corynebacterium glutamicum*.

En otra realización preferida, el microorganismo es un hongo, más preferentemente un hongo del género *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Kluyveromyces* o *Pichia* y aún más preferentemente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* o *Pichia pastoris*.

En una realización particularmente preferida, el microorganismo es un hongo recombinante, preferentemente una levadura que produce un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$, y que lo convierte en un compuesto de dieno tal como se describe con anterioridad en el presente documento.

En otra realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención hace uso de un microorganismo fotosintético que expresa una linalool deshidratasa-isomerasa. Preferentemente, el microorganismo es una bacteria fotosintética, o una microalga. Incluso más preferentemente, tal microorganismo tiene la propiedad natural o artificial de producir endógenamente un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$. En este caso el microorganismo será capaz de producir un dieno directamente a partir del CO_2 presente en la solución.

En otra realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención hace uso de un organismo multicelular que expresa una linalool deshidratasa-isomerasa. Los ejemplos de tales organismos son plantas o animales.

En una realización, el procedimiento implica cultivar microorganismos en condiciones de cultivo estándar (30-37 °C a 1 atm, en un fermentador que permite el crecimiento aeróbico de las bacterias). El butadieno y el isopreno tienen un punto de ebullición de -4 °C y 34 °C, respectivamente, y ya estarían en estado gaseoso si se eligiera una temperatura de 34 °C o superior para el cultivo. En una realización preferida, el procedimiento implica el cultivo de microorganismos en condiciones no estándar, preferentemente a una temperatura más alta para corresponder a las condiciones de cultivo de organismos termófilos. Esta realización tiene la ventaja de que incluso los dienos que tienen un punto de ebullición más alto, en particular dimetilbutadieno (con un punto de ebullición de 68 °C) se desgasificarían del cultivo y podrían ser recogidos fácilmente de la fase gaseosa. Por lo tanto, en particular en aquellas realizaciones del procedimiento según la invención en las que se produce dimetilbutadieno, el microorganismo es un microorganismo termófilo que puede cultivarse a temperaturas de 68 °C o superiores.

En una realización preferida adicional, el procedimiento según la invención que hace uso de un microorganismo se lleva a cabo de tal manera que el microorganismo se inmoviliza sobre un soporte.

En una realización preferida adicional, el procedimiento de la invención se lleva a cabo en condiciones microaerófilas. Esto significa que la cantidad de aire inyectado es limitante para minimizar las concentraciones residuales de oxígeno en los efluentes gaseosos que contienen el compuesto de dieno producido.

En otra realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo en condiciones de manera que el dieno producido se desgasifique de la reacción. Esto tiene la ventaja de que el equilibrio termodinámico de la reacción se desplaza hacia la producción del dieno conjugado. Se prefiere que el procedimiento comprenda además la etapa de recoger el dieno gaseoso. Por lo tanto, en una realización preferida, el procedimiento se lleva a cabo en presencia de un sistema para recoger el dieno producido en forma gaseosa durante la reacción.

En una realización particular, el procedimiento comprende también detectar el dieno producido (butadieno, isopreno

o dimetilbutadieno) que está presente en la fase gaseosa. La presencia del dieno a producir en un ambiente de aire u otro gas, incluso en pequeñas cantidades, se puede detectar usando diversas técnicas y, en particular, utilizando sistemas de cromatografía de gases con detección por infrarrojos o de ionización de llama, o por acoplamiento con espectrometría de masas.

- 5 La presente invención se refiere también al uso de un organismo que produce una linalool deshidratasa-isomerasa (EC 4.2.1.127) para la conversión de un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$ en $C_nH_{2n-2} + H_2O$, con $3 < n < 7$, como se ha descrito anteriormente en relación con el procedimiento de acuerdo con la invención. En una realización preferida, tal organismo es un organismo recombinante en el sentido de que está modificado genéticamente debido a la introducción de al menos una molécula de ácido nucleico que codifica una linalool deshidratasa-isomerasa. Preferentemente, tal molécula de ácido nucleico es heteróloga con respecto al organismo, lo que significa que no ocurre naturalmente en dicho organismo.

En una realización preferida, tal organismo es un organismo que produce un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$.

- 15 La presente invención se refiere también al uso de una linalool deshidratasa-isomerasa (EC 4.2.1.127) para la conversión de un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$ en $C_nH_{2n-2} + H_2O$, con $3 < n < 7$, como se ha descrito anteriormente en relación con el procedimiento de acuerdo con la invención.

- Además, la presente invención también se refiere a una composición que comprende un organismo que produce una linalool deshidratasa-isomerasa (EC 4.2.1.127) y un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$. La presente invención se refiere también a una composición que comprende una linalool deshidratasa-isomerasa y un compuesto que responde a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$.

En lo que respecta a las realizaciones preferidas de los diferentes componentes citados, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en relación con el procedimiento de acuerdo con la invención.

Figura 1 muestra esquemáticamente los alcoholes alílicos primarios (PRA) que responden a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$. En particular se muestran: Substrato/Nombre sistemático/Fórmula/Categoría/R¹/R²/Producto

- 25 **Figura 2** muestra esquemáticamente los alcoholes alílicos secundarios y terciarios (STA) que responden a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$. Substrato/Nombre sistemático/Fórmula/Categoría/R¹/R²/Producto

Figura 3 muestra esquemáticamente los alcoholes homoalílicos primarios (PHA) que responden a la fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$. Substrato/Nombre sistemático/Fórmula/Categoría/R¹/R²/Producto

- 30 **Figura 4** muestra una visión general esquemática de la conversión de los compuestos PRA, PHA y STA mencionados anteriormente en un dieno conjugado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.

Figura 5 muestra una visión general de las reacciones catalizadas por la linalool deshidratasa-isomerasa.

Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de la linalool deshidratasa-isomerasa de Castellaniella defragrans (anteriormente Alcaligenes defragrans).

- 35 **Figura 7** muestra los cromatogramas GC/FID obtenidos para ensayos enzimáticos (de color negro) y libres de enzimas (de color rojo) con *trans* alcohol crotilico 80 mM después de 22 horas de incubación.

Figura 8 muestra los cromatogramas GC/FID obtenidos para ensayos enzimáticos (de color negro) y libres de enzimas (de color rojo) con 3-buten-2-ol 80 mM después de 22 horas de incubación.

Figura 9 muestra los cromatogramas GC/FID obtenidos para ensayos enzimáticos (de color negro) y libres de enzimas (de color azul) con isoprenol 80 mM después de 22 horas de incubación.

- 40 **Figura 10** muestra los cromatogramas GC/FID obtenidos para ensayos enzimáticos (de color rojo) y libres de enzimas (de color negro) con 2-metil-3-buten-2-ol 80 mM después de 22 horas de incubación.

Figura 11 muestra la cinética de la producción de 1,3-butadieno para una gama de concentraciones de *trans* alcohol crotilico como se describe en el Ejemplo 7.

- 45 **Figura 12** muestra la cinética de la producción de 1,3-butadieno para una gama de concentraciones de but-3-en-2-ol como se describe en el Ejemplo 8.

Figura 13 muestra cromatogramas GC/FID obtenidos a partir de ensayos enzimáticos (de color rojo) y libres de enzimas (de color negro) con but-3-en-1-ol 50 mM después de 18 horas de incubación.

Figura 14 muestra cromatogramas GC/FID típicos obtenidos a partir de ensayos enzimáticos (de color rojo) y libres de enzimas (de color negro) con 2-metilbut-3-en-2-ol 160 mM después de 6 horas de incubación.

Figura 15 muestra cromatogramas GC/FID típicos obtenidos a partir de ensayos enzimáticos (de color rojo) y libres de enzimas (de color negro) con 3-metilbut-3-en-2-ol 50 mM después de 1 horas de incubación.

Figura 16 muestra la actividad de las versiones truncadas de linalool deshidratasa para la reacción global de conversión de alcohol crotilico en 1,3 butadieno y para la reacción de deshidratación de but-3-en-2-ol en 1,3 butadieno, respectivamente.

Figura 17 muestra que la linalool deshidratasa-isomerasa recombinante es capaz de catalizar la conversión de cis- o trans-alcohol crotilico en 1,3-butadieno.

Otros aspectos y ventajas de la invención se describirán en los siguientes ejemplos, que se dan con fines de ilustración y no a modo de limitación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Clonación y expresión en *E. coli* del gen para linalool deshidratasa-isomerasa

Clonación y cultivo bacteriano

La secuencia de linalool deshidratasa-isomerasa deducida del genoma de *Castellaniella defragrans* (anteriormente *Alcaligenes defragrans*) se generó por concatenación de oligonucleótidos para ajustarse al uso de codones de *E. coli*. Se insertó un tramo de 6 codones de histidina después del codón de inicio de metionina para proporcionar una etiqueta de afinidad para la purificación. El gen sintetizado de este modo se clonó en un vector de expresión pET25b(+) (el vector se construyó por GeneArt AG). Las células competentes de *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) se transformaron con este vector de acuerdo con el procedimiento de choque térmico. Como control negativo, la cepa de *E. coli* BL21(DE3) se transformó con un vector vacío. Las células transformadas se hicieron crecer con agitación (160 rpm) sobre medio de autoinducción ZYM-5052 (Studier FW, Prot. Exp. Pur. 41 (2005), 207-234) durante 6 horas a 37 °C y se continuó la expresión de la proteína a 18 °C durante una noche (aproximadamente 12 horas). Las células se recogieron por centrifugación a 4 °C, 10.000 rpm durante 20 minutos y los sedimentos se congelaron a -80 °C.

Preparación del lisado celular

Los sedimentos de 100 ml de células de cultivo se descongelaron sobre hielo y se suspendieron de nuevo en 4 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,5. Después se añadieron 10 µl de lisonasa (Novagen). Las células se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se devolvieron al hielo durante 20 minutos. La concentración de proteínas se determinó usando el procedimiento Bradford (Biorad).

Ejemplo 2: Producción de 1,3-butadieno a partir de (2E)-2-buten-1-ol (*trans* alcohol crotilico)

Los ensayos enzimáticos se realizaron en las siguientes condiciones:

Tris HCl 50 mM pH 7,5

D,L-Ditiotreitol 2 mM

(2E)-2-buten-1-ol (*trans* alcohol crotilico) 0-80 mM

El pH se ajustó a 7,5

Se añadieron 0,25 ml de lisado celular que contenía linalool deshidratasa-isomerasa recombinante a 0,5 ml de mezcla de reacción. Se realizó en paralelo una reacción de control libre de enzimas que contenía lisado de células de *E. coli* transformadas con vector vacío. Los ensayos se incubaron a 37 °C durante 1-22 horas en un vial de vidrio sellado de 2 ml (Interchim) con agitación. Se recogió entonces un ml de la fase de espacio vacío y se inyectó en un cromatógrafo de gases Varian 450-GC equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se utilizó nitrógeno como gas portador con un caudal de 1,5 ml/min. Los compuestos volátiles se separaron por cromatografía en una columna de enlace Rt-Alúmina/Na₂SO₄ (Restek) usando un modo isotérmico a 130 °C. El producto de reacción enzimático se identificó por comparación con el estándar de 1,3-butadieno (Sigma). En estas condiciones de GC, el tiempo de retención para el butadieno fue de 7,6 min. Se observó una producción significativa de 1,3-butadieno en el ensayo enzimático con linalool deshidratasa-isomerasa. No se observó señal de butadieno en el ensayo de control libre de enzimas (Figura 7). El número de recambios para esta conversión ascendió a aproximadamente $3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ moléculas de sustrato por sitio activo enzimático.

Ejemplo 3: Producción de 1,3-butadieno a partir de 3-buten-2-ol

Los ensayos enzimáticos se realizaron en las siguientes condiciones:

Tris HCl 50 mM pH 7,5

D,L-Ditiotreitol 2 mM

3-buten-2-ol 0-80 mM

El pH se ajustó a 7,5

- 5 Se añadieron 0,25 ml de lisado celular que contenía linalool deshidratasa-isomerasa recombinante a 0,5 ml de mezcla de reacción. Se realizó en paralelo una reacción de control libre de enzimas que contenía lisado de células de *E. coli* transformadas con vector vacío. Los ensayos se incubaron a 37 °C durante 1-22 horas en un vial de vidrio sellado de 2 ml (Interchim) con agitación. Se analizó la producción de 1,3-butadieno mediante el procedimiento GC/FID como se describe en el ejemplo 2. Se observó una producción significativa de 1,3-butadieno en un ensayo
- 10 enzimático con linalool deshidratasa-isomerasa. No se observó ninguna señal de butadieno en el ensayo de control libre de enzimas (Figura 8). El número de recambios para esta conversión ascendió a aproximadamente 10^{-4} s^{-1} moléculas de sustrato por sitio activo enzimático.

También se realizaron experimentos similares usando el enantiopuro R y S but-3-en-2-ol, y se observaron resultados similares.

15 **Ejemplo 4: Producción de 2-metil-1,3-butadieno (isopreno) a partir de 3-metil-2-buten-1-ol (prenol)**

Los ensayos enzimáticos se realizaron en las siguientes condiciones:

Tris HCl 50 mM pH 7,5

D,L-Ditiotreitol 2 mM

3-metil-2-buten-1-ol (prenol) 0-80 mM

- 20 El pH se ajustó a 7,5

- Se añadieron 0,25 ml de lisado celular que contenía linalool deshidratasa-isomerasa recombinante a 0,5 ml de mezcla de reacción. Se realizó en paralelo una reacción de control libre de enzimas que contenía lisado de células de *E. coli* transformadas con vector vacío. Los ensayos se incubaron a 37 °C durante 1-22 horas en un vial de vidrio sellado de 2,0 ml (Interchim) con agitación. Se recogieron entonces 100 µl de la fase de espacio vacío y se inyectó
- 25 en un cromatógrafo de gases Varian 450-GC equipado con un detector de ionización de llama (FID). Los compuestos volátiles de la fase de espacio vacío se separaron en la columna Rtx-1 (Restek) usando nitrógeno como gas portador con un caudal de 1,5 ml/min. El ciclo del horno para cada muestra fue de 100 °C durante 4 minutos, aumentando la temperatura a 20 °C/minuto a una temperatura de 130 °C, y se mantuvo a 130 °C durante 1,5 minutos. El tiempo total de realización fue de 7 min. El producto de reacción enzimático se identificó por
- 30 comparación con el estándar de isopreno (Sigma). En estas condiciones de GC, el tiempo de retención para el isopreno fue de 3,08 min. Se observó una producción significativa de isopreno en el ensayo enzimático con linalool deshidratasa-isomerasa. Se observó una señal insignificante de isopreno correspondiente a la descomposición espontánea de prenol en el ensayo de control libre de enzima (Tabla 1). El número de recambios para esta conversión ascendió a aproximadamente $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ moléculas de sustrato por sitio activo enzimático.

- 35 Tabla 1. Producción de isopreno después de 22 horas de incubación en ensayos con prenol 80 mM.

Ensayo	Área pico de isopreno, unidades arbitrarias
Ensayo enzimático con linalool deshidratasa-isomerasa	29705,4
Ensayo de control libre de enzimas	7,5

Ejemplo 5: Producción de 2-metil-1,3-butadieno (isopreno) a partir de 3-metil-3-buten-1-ol (isoprenol)

Los ensayos enzimáticos se realizaron en las siguientes condiciones:

Tris HCl 50 mM pH 7,5

- 40 D,L-Ditiotreitol 2 mM

3-metil-3-buten-1-ol (isoprenol) 0-80 mM

El pH se ajustó a 7,5

Se añadieron 0,25 ml de lisado celular que contenía linalool deshidratasa-isomerasa recombinante a 0,5 ml de mezcla de reacción. Se realizó en paralelo una reacción de control libre de enzimas que contenía lisado de células de *E. coli* transformadas con vector vacío.

- 5 Los ensayos se incubaron a 37 °C durante 1-22 horas en un vial de vidrio sellado de 2 ml (Interchim) con agitación. Se analizó la producción de isopreno mediante el procedimiento GC/FID como se describe en el ejemplo 4. Se observó una producción significativa de isopreno en un ensayo enzimático con linalool deshidratasa-isomerasa. No se observó ninguna señal de isopreno en el ensayo de control libre de enzimas (Figura 9). El número de recambios para esta conversión ascendió a aproximadamente $3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ moléculas de sustrato por sitio activo enzimático.

10 **Ejemplo 6: Producción de 2-metil-1,3-butadieno (isopreno) a partir de 2-metil-3-buten-2-ol**

Los ensayos enzimáticos se realizaron en las siguientes condiciones:

Tris HCl 50 mM pH 7,5

D,L-Ditiotreitol 2 mM

2-metil-3-buten-2-ol 0-80 mM

15

El pH se ajustó a 7,5

- 20 Se añadieron 0,25 ml de lisado celular que contenía linalool deshidratasa-isomerasa recombinante, a 0,5 ml de mezcla de reacción. Se realizó en paralelo una reacción de control libre de enzimas que contenía lisado de células de *E. coli* transformadas con vector vacío. Los ensayos se incubaron a 37 °C durante 1-22 horas en un vial de vidrio sellado de 2 ml (Interchim) con agitación. Se analizó la producción de isopreno mediante el procedimiento GC/FID como se describe en el ejemplo 4. Se observó una producción significativa de isopreno en un ensayo enzimático con linalool deshidratasa-isomerasa. No se observó ninguna señal de isopreno en el ensayo de control libre de enzimas (Figura 10). El número de recambios para esta conversión ascendió a aproximadamente 10^{-3} s^{-1} moléculas de sustrato por sitio activo enzimático.

25 **Ejemplo 7: Cinética de producción de 1,3-butadieno a partir de (E)-but-2-en-1-ol (*trans* alcohol crotilico)**

Lisis celular y preparación de sobrenadante

- 30 El lisado celular se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 con las siguientes modificaciones. El sedimento obtenido a partir de 200 ml de células cultivadas se descongeló sobre hielo y se suspendió de nuevo en 3 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, complementado con D,L-ditiotreitol 4 mM, glutatión 20 mM, MgCl_2 25 mM y KCl 25 mM. Después se añadieron 10 μl de lisonasa (Merck). Las células se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se devolvieron al hielo durante 20 minutos. El lisado celular se clarificó por centrifugación a 13.000 rpm, 4 °C durante 10 min. El sobrenadante recogido se concentró en una unidad de filtro Amicon Ultra-4 de 10 kDa (Millipore). El nivel de expresión de linalool deshidratasa-isomerasa se estimó mediante análisis de SDS-PAGE del sobrenadante. La concentración de proteína total se determinó usando el procedimiento Bradford (Biorad).

35

Ensayo enzimático

Los ensayos enzimáticos se realizaron en las siguientes condiciones:

Tris-HCl 50 mM pH 7,5

trans alcohol crotilico 0-160 mM (Alfa Aesar)

- 40 Se añadieron 0,2-0,4 ml del sobrenadante que contenía la linalool deshidratasa-isomerasa recombinante a 0,5 ml de mezcla de reacción. La concentración de linalool deshidratasa-isomerasa en el ensayo fue de aproximadamente 1,2 mg/ml. Se llevaron a cabo en paralelo reacciones de control libres de enzimas que contenían sobrenadante de células de *E. coli* transformadas con un vector vacío. Las reacciones se incubaron a 37 °C en un vial de vidrio sellado de 2 ml (Interchim) con agitación. Las reacciones se detuvieron congelando los tubos de ensayo a -80 °C. La producción de butadieno se midió analizando alícuotas muestreadas durante un periodo de incubación de 5,5 horas. La cantidad de 1,3-butadieno producida se cuantificó por cromatografía de gases (GC) de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. La Figura 11 muestra la cinética de la producción de 1,3-butadieno para una gama de concentraciones de *trans* alcohol crotilico.

45

Ejemplo 8: Cinética de la producción de 1,3-butadieno a partir de but-3-en-2-ol

El lisado celular clarificado que contenía la linalool deshidratasa-isomerasa recombinante se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 7.

Ensayo enzimático

Los ensayos enzimáticos se realizaron en las siguientes condiciones:

5 Tris-HCl 50 mM pH 7,5

but-3-en-2-ol 0-160 mM (Sigma-Aldrich)

Se añadieron 0,2-0,4 ml del sobrenadante que contenía la linalool deshidratasa-isomerasa recombinante a 0,5 ml de mezcla de reacción. La concentración de linalool deshidratasa-isomerasa en el ensayo fue de aproximadamente 1,2 mg/ml. Se llevaron a cabo en paralelo reacciones de control libres de enzimas que contenían sobrenadante de células de *E. coli* transformadas con un vector vacío. Los ensayos se incubaron a 37 °C en un vial de vidrio sellado de 2 ml (Interchim) con agitación. Las reacciones se detuvieron congelando los tubos de ensayo a -80 °C. La producción de butadieno se midió analizando alícuotas muestreadas durante un periodo de incubación de 5,5 horas. La cantidad de 1,3-butadieno producida se cuantificó por cromatografía de gases (GC) de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. La Figura 12 muestra la cinética de la producción de 1,3-butadieno para una gama de concentraciones de but-3-en-2-ol.

Ejemplo 9: Producción 1,3-butadieno a partir de but-3-en-1-ol (isoalcohol crotilico)

Preparación del lisado celular

El lisado celular se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 con las siguientes modificaciones. El sedimento obtenido a partir de 200 ml de células cultivadas se descongeló sobre hielo y se suspendió de nuevo en 3 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, complementado con D,L-ditiotreitol 4 mM, glutatión 20 mM, MgCl₂ 25 mM y KCl 25 mM. Después se añadieron 10 µl de lisonasa (Merck). Las células se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se devolvieron al hielo durante 20 minutos.

Ensayo enzimático

Los ensayos enzimáticos se realizaron en las siguientes condiciones:

25 Tris-HCl 50 mM pH 7,5

but-3-en-1-ol 50 mM (Sigma)

Se añadieron 0,4 ml de lisado celular que contenía la linalool deshidratasa-isomerasa recombinante a 0,5 ml de la mezcla de reacción. Se realizó en paralelo una reacción de control libre de enzimas que contenía lisado de células de *E. coli* transformadas con vector vacío. Los ensayos se incubaron a 37 °C durante 18 horas en un vial de vidrio sellado de 2 ml (Interchim) con agitación. Se recogió entonces un ml de la fase de espacio vacío y se inyectó en un cromatógrafo de gases Varian 450-GC equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se utilizó nitrógeno como gas portador con un caudal de 6 ml/min. Los compuestos volátiles se separaron por cromatografía en una columna J&W GS-Alumina (30 m x 0,53 mm de DI) (Restek) usando un modo isotérmico a 130 °C. El producto de reacción enzimático se identificó por comparación con el estándar de 1,3-butadieno (Sigma-Aldrich). Bajo estas condiciones de GC, el tiempo de retención para el butadieno fue de 3,05 min. Se produjo 1,3-butadieno en el ensayo enzimático en presencia de linalool deshidratasa-isomerasa, no se observó señal de butadieno en el ensayo de control libre de enzimas (Figura 13).

Ejemplo 10: Producción de 2-metil-1,3-butadieno (isopreno) a partir de 2-metilbut-3-en-2-ol

Durante otra ronda de experimentos, se reprodujo la reacción ensayada en el Ejemplo 6 y se confirmó el resultado. Las condiciones de ensayo exactas fueron las siguientes:

El lisado celular clarificado que contenía la linalool deshidratasa-isomerasa recombinante se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 7.

Ensayo enzimático

Los ensayos enzimáticos se realizaron en las siguientes condiciones:

45 Tris-HCl 50 mM pH 7,5

2-metilbut-3-en-2-ol 160 mM (Sigma)

Se añadieron 0,2-0,4 ml del sobrenadante que contenía la linalool deshidratasa-isomerasa recombinante a 0,5 ml de mezcla de reacción. La concentración de linalool deshidratasa-isomerasa en el ensayo fue de aproximadamente 1,2 mg/ml. Se llevaron a cabo en paralelo reacciones de control libres de enzimas que contenían sobrenadante de

células de *E. coli* transformadas con un vector vacío. Los ensayos se incubaron durante 6 horas a 37 °C en un vial sellado de 2 ml (Interchim) con agitación. Las reacciones se detuvieron entonces congelando los tubos de ensayo a -80 °C

- 5 Se recogió entonces un ml de la fase de espacio vacío y se inyectó en un cromatógrafo de gases Varian 450-GC equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se utilizó nitrógeno como gas portador con un caudal de 1,5 ml/min. Los compuestos volátiles se separaron cromatográficamente sobre columna en enlace Rt-Alúmina/Na₂SO₄ (Restek) usando un modo isotérmico a 155 °C. El producto de reacción enzimático se identificó por comparación con un estándar de isopreno (Sigma-Aldrich). En estas condiciones de GC, el tiempo de retención para el isopreno fue de 7,5 min.
- 10 Se observó una producción significativa de isopreno en el ensayo enzimático establecido en presencia de linalool deshidratasa-isomerasa. No se observó ninguna señal de isopreno en el ensayo de control libre de enzimas (Figura 14).

Ejemplo 11: Producción de 2-metil-1,3-butadieno (isopreno) a partir de 3-metilbut-3-en-2-ol

Preparación del lisado celular

- 15 El lisado celular se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 con las siguientes modificaciones. El sedimento obtenido a partir de 200 ml de células cultivadas se descongeló sobre hielo y se suspendió de nuevo en 3 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, que contenía D,L-ditiotreitol 4 mM, glutatión 20 mM, MgCl₂ 25 mM y KCl 25 mM. Después se añadieron 10 µl de lisonasa (Merck). Las células se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se devolvieron al hielo durante 20 minutos.

Ensayo enzimático

Los ensayos enzimáticos se realizaron en las siguientes condiciones:

Tris-HCl 50 mM pH 7,5

3-metilbut-3-en-2-ol 50 mM (Sigma-Aldrich)

- 25 Se añadieron 0,45 ml de lisado celular que contenía linalool deshidratasa-isomerasa recombinante a 0,5 ml de mezcla de reacción. Se realizó en paralelo una reacción de control libre de enzimas que contenía lisado de células de *E. coli* transformadas con vector vacío. Los ensayos se incubaron a 37 °C durante 1 hora en un vial de vidrio sellado de 2 ml (Interchim) con agitación. Se recogió entonces un ml de la fase de espacio vacío y se inyectó en un cromatógrafo de gases Varian 450-GC equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se utilizó nitrógeno como gas portador con un caudal de 6 ml/min. Los compuestos volátiles se separaron por cromatografía en una columna J&W GS-Alumina (30 m x 0,53 mm de DI) (Restek) usando un modo isotérmico a 150 °C. El producto de reacción enzimático se identificó por comparación con un estándar de isopreno (Sigma-Aldrich). En estas condiciones de GC, el tiempo de retención para el isopreno fue de 3,85 min. Una cantidad significativa de isopreno se produjo en el ensayo enzimático en presencia de linalool deshidratasa-isomerasa; se observó una señal insignificante de isopreno correspondiente a la descomposición espontánea de 3-metilbut-3-en-2-ol en el ensayo de control libre de enzimas (Figura 15, Tabla 2).
- 35

Tabla 2: Producción de isopreno después de 1 hora de incubación en ensayos con 3-metilbut-3-en-2-ol 50 mM.

Ensayo	Área pico de isopreno, unidades arbitrarias
Ensayo enzimático con linalool deshidratasa-isomerasa	24334,5
Ensayo de control libre de enzimas	66,4

Ejemplo 12: Variantes truncadas de linalool deshidratasa: la actividad con respecto a la reacción global de conversión de alcohol crotilico en 1,3-butadieno y para la reacción de deshidratación de but-3-en-2-ol en 1,3-butadieno

- 40 Diversas selecciones que buscan mejora en la actividad y la solubilidad de la linalool deshidratasa-isomerasa han conducido a la identificación de una colección de 9 variantes de la enzima, que están truncadas en la porción C-terminal. La enzima de longitud completa de tipo salvaje corresponde a M1-K397 como se muestra en la SEQ ID NO: 1. Las versiones truncadas observadas son M1-L385, M1-R386, M1-P388, M1-P389, M1-A391, M1-K393, M1-L394, M1-A395 y M1-G396 como se muestra en la SEQ ID NO: 1. En estas versiones truncadas en el extremo C,
- 45 sólo la longitud de la proteína ha sido modificada, el resto de la secuencia de la proteína permanece sin cambios. La variante más corta (M1-L385) tiene una identidad del 96,9 %.

La actividad se ensayó de acuerdo con el siguiente ensayo:

Este ensayo se estableció como se indica a continuación. La colección de variantes de linalool deshidratasa-isomerasa truncadas C-terminalmente clonadas en el vector de expresión comercial pET25b+ se transformó en células competentes BL21(DE3). Se usaron clones aislados para inocular 1 ml de medio de autoinducción (Studier FW, Prot.Exp.Pur. 41, (2005), 207-234) y se cultivaron durante la noche a 30 °C durante 20-22 horas en una incubadora de agitación ajustada a 700 rpm y un 85 % de humedad. Las células se sedimentaron y se almacenaron a -80 °C durante una noche. Estos sedimentos celulares que contienen los variantes de linalool deshidratasa-isomerasa recombinante expresada se suspendieron de nuevo en una mezcla de reacción que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5, KCl 25 mM, MgCl₂ 25 mM, DTT 4 mM, glutatión 10 mM con trans alcohol crotilico 50 mM (Alfa Aesar) o but-3-en-2-ol 50 mM (Sigma Aldrich). Las reacciones de control se establecieron usando clones bacterianos que contenían el vector de expresión vacío pET25b+ o el vector de expresión que expresaba la enzima de tipo silvestre. Esta mezcla de reacción se incubó durante 16 horas a 37 °C y la reacción se detuvo en una incubación de 5 minutos a 80 °C. La cantidad de 1,3-butadieno producido se cuantificó entonces por cromatografía de gases (GC). Para el análisis del espacio vacío de GC, se inyectaron 300 µl de gas de espacio vacío en un sistema Bruker GC450 equipado con una columna RT-Alúmina (5 m x 0,32 mm) Restek y un sistema de detección de ionización de llama (FID). El procedimiento de análisis por GC utilizado para detectar 1,3-butadieno se caracteriza por una temperatura constante del horno a 140 °C, una temperatura de puerto de inyección a 200 °C con una relación de división de 1:4 y la temperatura del detector FID a 250 °C. Se utilizó nitrógeno como gas portador (flujo constante de 1,25 ml/min) y se utilizó una mezcla de aire (flujo de aire 300 ml/min), nitrógeno (flujo de 28 ml/min) e hidrógeno (flujo de 30 ml/min) para suministrar el sistema de detección FID.

En la Figura 16 se muestra la actividad de las versiones truncadas anteriores de linalool deshidratasa para la reacción global de conversión de alcohol crotilico en 1,3 butadieno y para la reacción de deshidratación de but-3-en-2-ol en 1,3 butadieno, respectivamente.

Ejemplo 13: La linalool deshidratasa-isomerasa recombinante cataliza la conversión de alcohol crotilico, estereoisómeros *cis* y *trans*-alcohol crotilico en 1,3-butadieno

El gen que codifica la linalool deshidratasa-isomerasa recombinante se subclonó en el vector de expresión bacteriano comercial Novagen pET-25b+, se transformó en células competentes BL21(DE3) y se puso en placas de agar LB complementadas con el antibiótico apropiado. También se transformaron células BL21(DE3) competentes con el vector pET-25b+ a usar como control negativo en los ensayos enzimáticos posteriores. Se usaron transformantes individuales para inocular 500 ml de medio de autoinducción (Studier F.W, 2005, loc. cit.) y los cultivos se incubaron durante una noche a 30 °C en una incubadora de agitación. Los sedimentos celulares se almacenaron durante la noche a -80 °C antes de suspenderse de nuevo en 7,5 ml de tampón de lisis (Tris-Cl 50 mM a pH7.5, DTT 4 mM, MgCl₂ 25 mM, KCl 25 mM) complementado con 50 µl de lisosoma de Merck Novagen. Las suspensiones celulares se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente seguido de 20 minutos en hielo. Los lisados celulares se clarificaron a continuación por centrifugación y los sobrenadantes se concentraron 2 veces usando un concentrador de filtración (Amicon Ultra - Millipore). La cantidad de la linalool deshidratasa-isomerasa recombinante presente en la fracción soluble concentrada se estimó en gel de SDS-PAGE contra una curva de calibración de albúmina de suero bovino usando densitometría de gel. Las reacciones enzimáticas se establecieron en viales de vidrio de 2 ml (Interchim) con 225 µl del sobrenadante de lisado celular, un intervalo de 0 a 100 mM *trans*-alcohol crotilico (Alfa Aesar) o *cis*-alcohol crotilico (ChemSampCo), DTT 4 mM, MgCl₂ 25 mM, KCl 25 mM, glutatión 4 mM y Tris-Cl 50 mM a pH 7,5 en un volumen de reacción final de 250 µl. Las reacciones enzimáticas se establecieron utilizando el lisado celular que contenía la linalool deshidratasa-isomerasa recombinante o el lisado celular obtenido a partir de células transformadas con el vector de expresión vacío. Los viales se sellaron y se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Las reacciones enzimáticas se detuvieron por incubación durante 5 minutos a 80 °C y el 1,3-butadieno presente en el espacio vacío de reacción se cuantificó mediante cromatografía de gases (GC). Para el análisis del espacio vacío de GC, se inyectaron 300 µl de gas de espacio vacío en un sistema Bruker GC450 equipado con una columna RT-Alúmina (5 m x 0,32 mm) Restek y un sistema de detección de ionización de llama (FID). El procedimiento de análisis por GC utilizado para detectar 1,3-butadieno se caracteriza por una temperatura constante del horno a 140 °C (modo isotérmico), una temperatura de puerto de inyección a 200 °C con una relación de división de 1:4 y la temperatura del detector FID a 250 °C. Se utilizó nitrógeno como gas portador (flujo constante de 1,25 ml/min) y se utilizó una mezcla de aire (flujo de aire 300 ml/min), nitrógeno (flujo de 28 ml/min) e hidrógeno (flujo de 30 ml/min) para suministrar el sistema de detección FID. El producto de reacción enzimático se identificó por comparación con un patrón de 1,3-butadieno (Sigma-Aldrich). Bajo estas condiciones de GC, el tiempo de retención para el butadieno es de 1,05 min. La Figura 17 muestra que la linalool deshidratasa-isomerasa recombinante es capaz de catalizar la conversión de *cis*- o *trans*-alcohol crotilico en 1,3-butadieno. No se observó una señal significativa de 1,3-butadieno en las reacciones de control libres de enzimas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Scientist of Fortune S.A.

<120> Producción de dienos volátiles por deshidratación enzimática de alquenoles ligeros

<130> U2499 PCT S3

<150> EP 12 18 2270.4

<151> 29-08-2012

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1

<211> 397

<212> PRT

<213> Castellaniella defragrans

<400> 1

```

Met Arg Phe Thr Leu Lys Thr Thr Ala Ile Val Ser Ala Ala Ala Leu
1           5           10           15

Leu Ala Gly Phe Gly Pro Pro Pro Arg Ala Ala Glu Leu Pro Pro Gly
          20           25           30

Arg Leu Ala Thr Thr Glu Asp Tyr Phe Ala Gln Gln Ala Lys Gln Ala
          35           40           45

Val Thr Pro Asp Val Met Ala Gln Leu Ala Tyr Met Asn Tyr Ile Asp
          50           55           60

Phe Ile Ser Pro Phe Tyr Ser Arg Gly Cys Ser Phe Glu Ala Trp Glu
65           70           75           80

Leu Lys His Thr Pro Gln Arg Val Ile Lys Tyr Ser Ile Ala Phe Tyr
          85           90           95

Ala Tyr Gly Leu Ala Ser Val Ala Leu Ile Asp Pro Lys Leu Arg Ala
          100          105          110

Leu Ala Gly His Asp Leu Asp Ile Ala Val Ser Lys Met Lys Cys Lys
          115          120          125

Arg Val Trp Gly Asp Trp Glu Glu Asp Gly Phe Gly Thr Asp Pro Ile
          130          135          140

Glu Lys Glu Asn Ile Met Tyr Lys Gly His Leu Asn Leu Met Tyr Gly
145          150          155          160

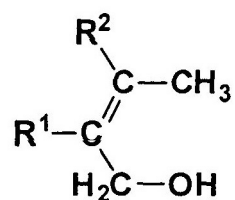
```

ES 2 643 865 T3

Leu Tyr Gln Leu Val Thr Gly Ser Arg Arg Tyr Glu Ala Glu His Ala
 165 170 175
 His Leu Thr Arg Ile Ile His Asp Glu Ile Ala Ala Asn Pro Phe Ala
 180 185 190
 Gly Ile Val Cys Glu Pro Asp Asn Tyr Phe Val Gln Cys Asn Ser Val
 195 200 205
 Ala Tyr Leu Ser Leu Trp Val Tyr Asp Arg Leu His Gly Thr Asp Tyr
 210 215 220
 Arg Ala Ala Thr Arg Ala Trp Leu Asp Phe Ile Gln Lys Asp Leu Ile
 225 230 235 240
 Asp Pro Glu Arg Gly Ala Phe Tyr Leu Ser Tyr His Pro Glu Ser Gly
 245 250 255
 Ala Val Lys Pro Trp Ile Ser Ala Tyr Thr Thr Ala Trp Thr Leu Ala
 260 265 270
 Met Val His Gly Met Asp Pro Ala Phe Ser Glu Arg Tyr Tyr Pro Arg
 275 280 285
 Phe Lys Gln Thr Phe Val Glu Val Tyr Asp Glu Gly Arg Lys Ala Arg
 290 295 300
 Val Arg Glu Thr Ala Gly Thr Asp Asp Ala Asp Gly Gly Val Gly Leu
 305 310 315 320
 Ala Ser Ala Phe Thr Leu Leu Leu Ala Arg Glu Met Gly Asp Gln Gln
 325 330 335
 Leu Phe Asp Gln Leu Leu Asn His Leu Glu Pro Pro Ala Lys Pro Ser
 340 345 350
 Ile Val Ser Ala Ser Leu Arg Tyr Glu His Pro Gly Ser Leu Leu Phe
 355 360 365
 Asp Glu Leu Leu Phe Leu Ala Lys Val His Ala Gly Phe Gly Ala Leu
 370 375 380
 Leu Arg Met Pro Pro Pro Ala Ala Lys Leu Ala Gly Lys
 385 390 395

REIVINDICACIONES

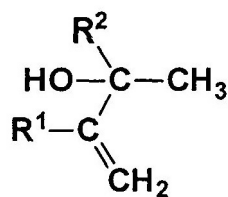
- 1.- Un procedimiento de producción de un dieno conjugado **caracterizado porque** comprende una etapa de convertir enzimáticamente un compuesto de fórmula general $C_nH_{2n}O$ en $C_nH_{2n-2} + H_2O$, con $3 < n < 7$, haciendo uso de una linalool deshidratasa-isomerasa (EC 4.2.1.127).
- 5 2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$, es un alcohol alílico primario (PRA) de fórmula I:



Fórmula I

en la que R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de H y CH_3 .

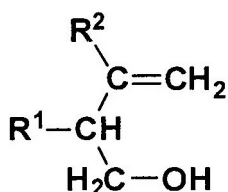
- 10 3.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$, es un alcohol alílico secundario o terciario (STA) de fórmula II:



Fórmula II

en la que R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de H y CH_3 .

- 4.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$, es un alcohol homoalílico primario (PHA) de fórmula III:



Fórmula III

15 en la que R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de H y CH_3 .

- 5.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se realiza *in vitro* (en un sistema libre de células).
- 20 6.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el procedimiento se realiza haciendo uso de un microorganismo que produce dicha linalool deshidratasa-isomerasa (EC 4.2.1.127).
- 7.- El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el microorganismo es capaz de producir un compuesto de fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$.
- 8.- Uso de un linalool deshidratasa-isomerasa (EC 4.2.1.127) o de un microorganismo que produce una linalool deshidratasa para convertir un compuesto de fórmula general $C_nH_{2n}O$ en $C_nH_{2n-2} + H_2O$, con $3 < n < 7$.

- 9.- Una composición que comprende un organismo que produce una linalool deshidratasa-isomerasa (EC 4.2.1.127) y un compuesto de fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$.
- 10.- Una composición que comprende una linalool deshidratasa-isomerasa (EC 4.2.1.127) y un compuesto de fórmula general $C_nH_{2n}O$, con $3 < n < 7$.
- 5 11.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el uso de la reivindicación 8 o la composición de la reivindicación 9 o 10, en el que la linalool deshidratasa-isomerasa (EC 4.2.1.127) es una proteína que comprende la secuencia aminoacídica como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia aminoacídica que es al menos un 60 % idéntica a la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 1 y que muestra la actividad enzimática de convertir un compuesto de fórmula general $C_nH_{2n}O$ en $C_nH_{2n-2} + H_2O$, con $3 < n < 7$.
- 10 12.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 u 11 o el uso de la reivindicación 8 u 11, en el que n es 4 y el compuesto de dieno producido es butadieno, o la composición de la reivindicación 9, 10 u 11, en la que n es 4.
- 13.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 u 11 o el uso de la reivindicación 8 u 11, en el que n es 5 y el compuesto de dieno producido es isopreno, o la composición de la reivindicación 9, 10 u 11, en la que n es 5.
- 15 14.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 u 11 o el uso de la reivindicación 8 u 11, en el que n es 6 y el compuesto de dieno producido es dimetil-butadieno, o la composición de la reivindicación 9, 10 u 11, en la que n es 6.

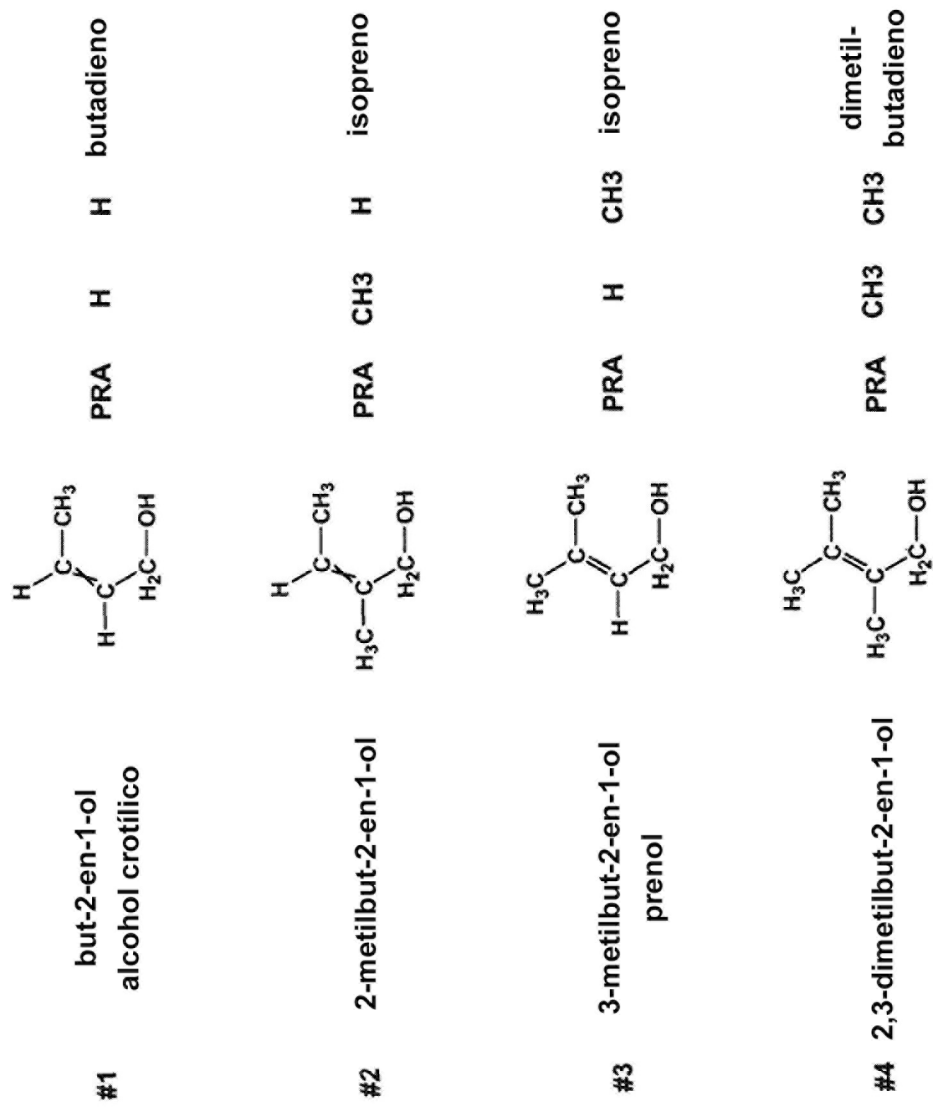


Figura 1

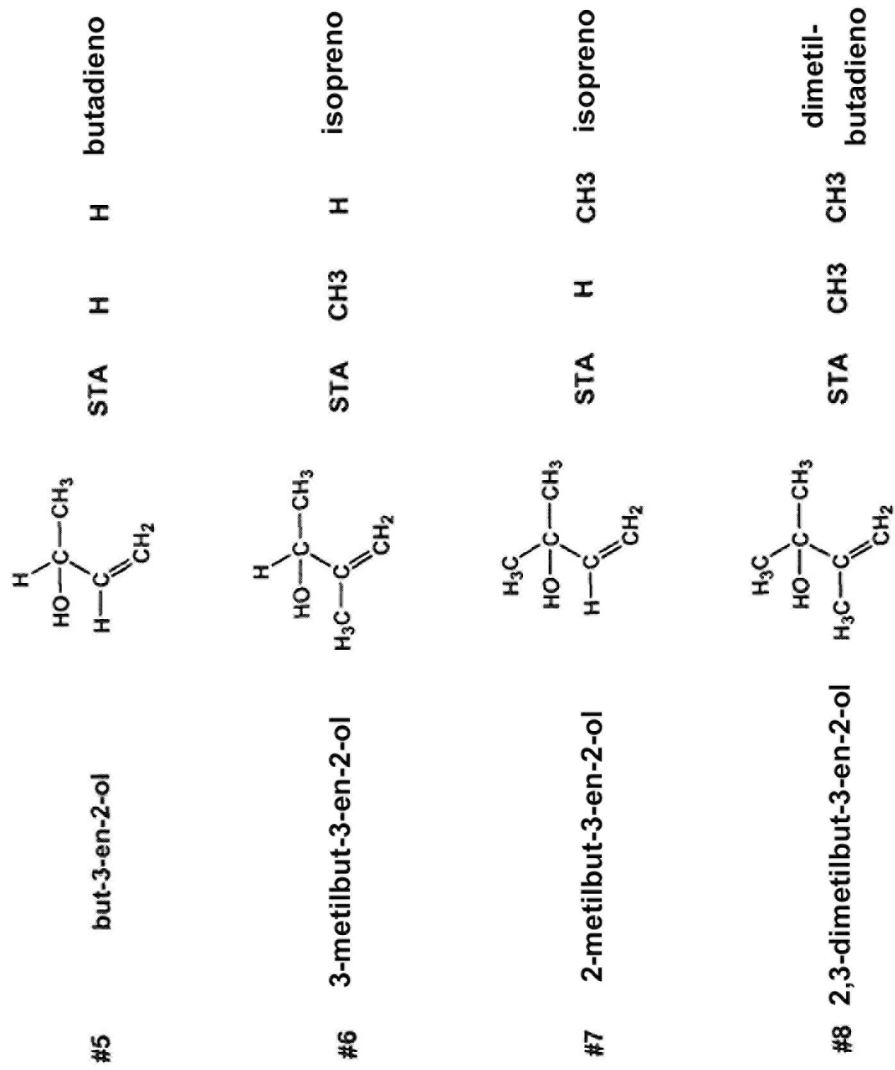


Figura 2

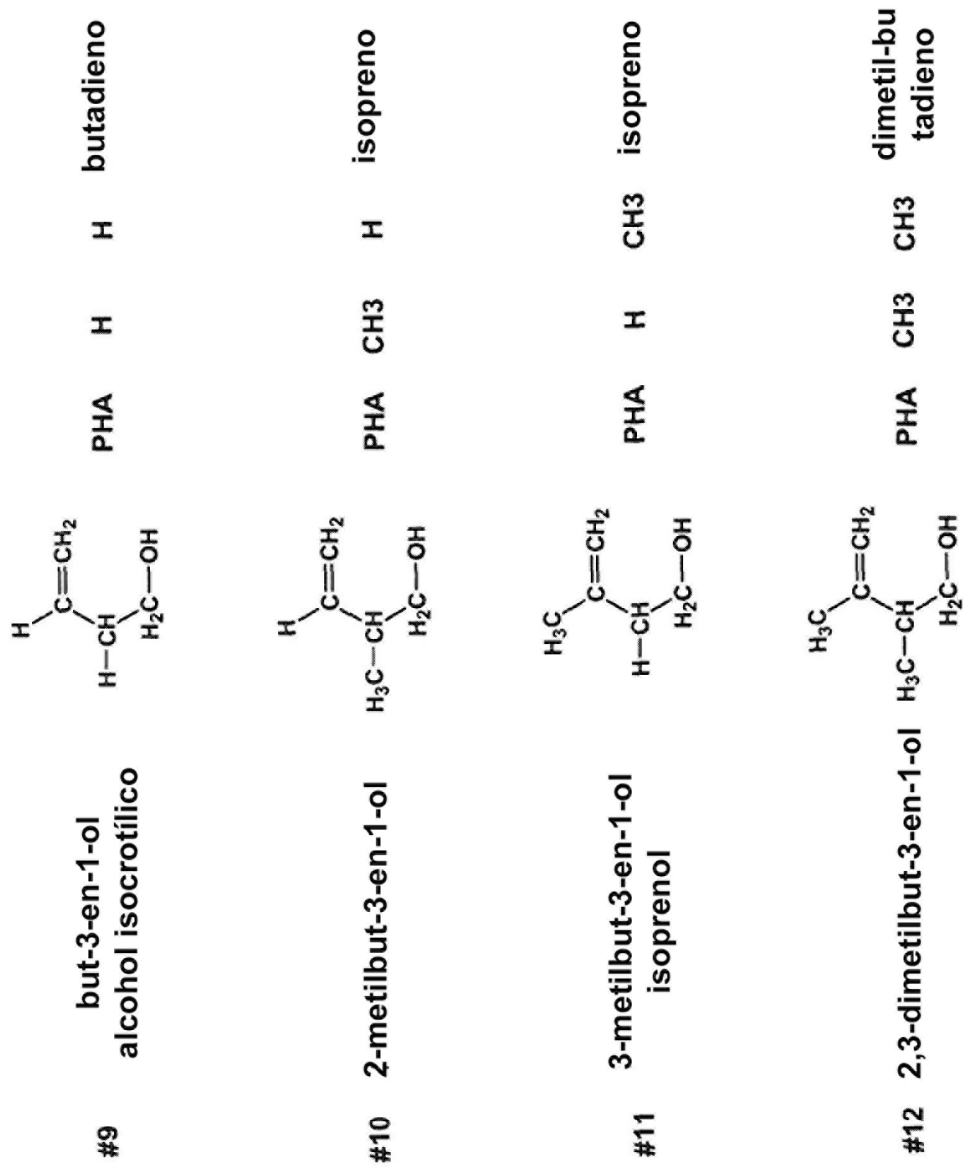


Figura 3

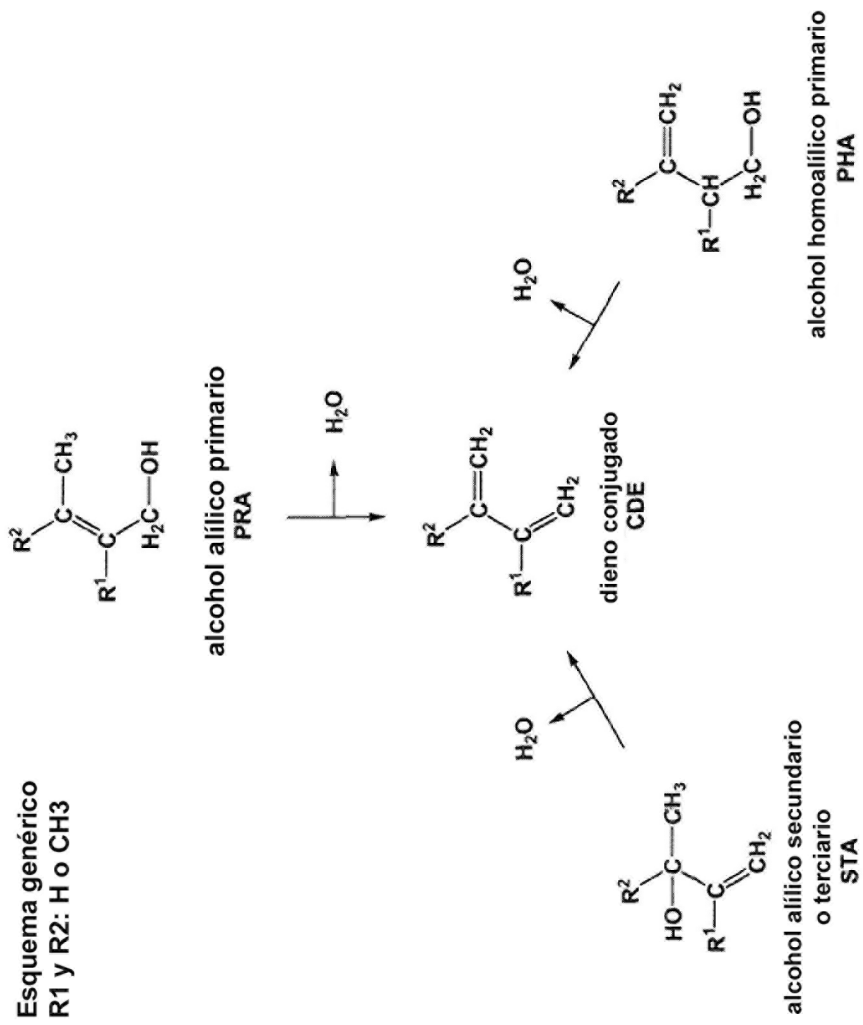


Figura 4

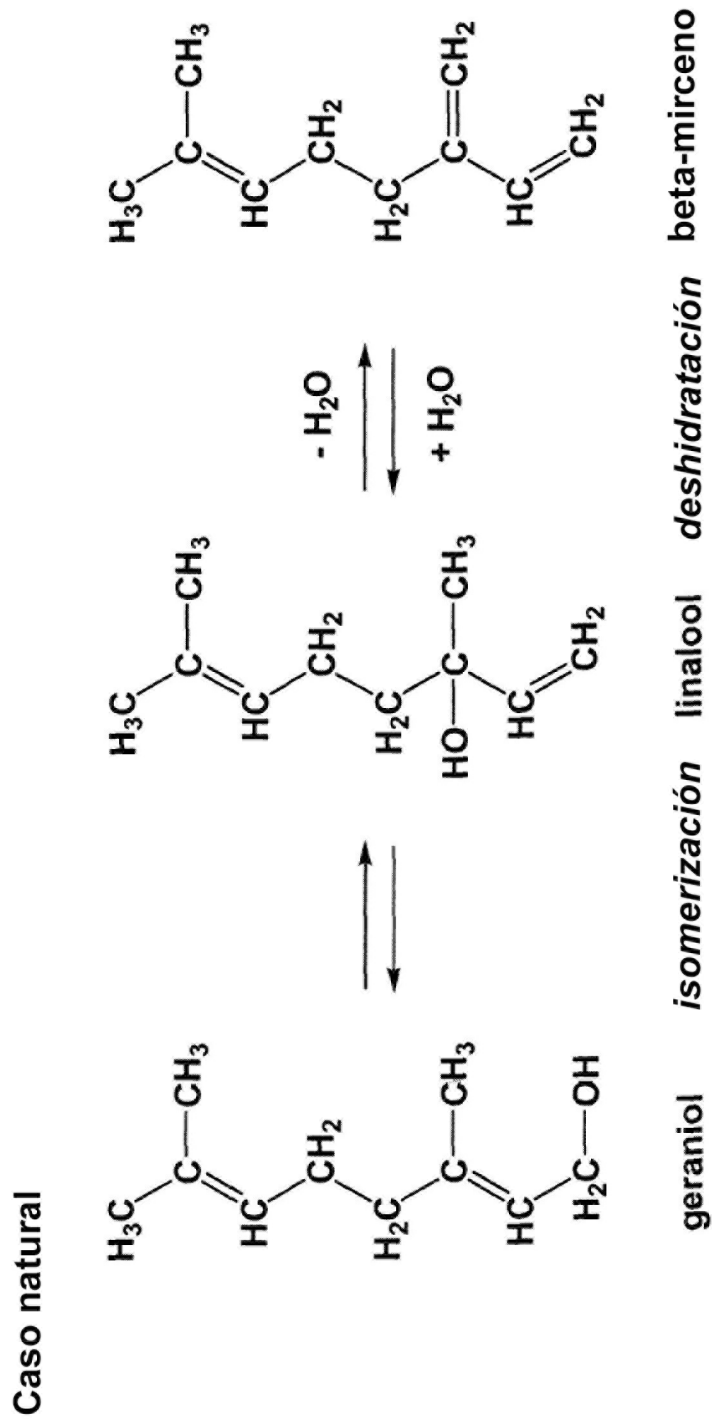


Figura 5

MRFTLKTITVSAALLAGFGPPRAAELPPGRLATTEDYFAQQAKQAVTPDVMAQLAYM
 NYIDFISPFYSRGCSFEAWELKHTPQRVVIKYSIAFYAYGLASVALIDPKLRALAGHDLDI
 AVSKMKCKRVWGDWEEDGFGTDPIEKENIMYKGHNLNMYGLYQLVTGSRRYEAHAHLTR
 I IHDEIAANPFAGIVCEPDNYFVQCNSVAYLSLWVYDRHLHGTDYRAATRAWLDFIQKDLI
 DPERGAFYLSYHPESGAVKFWISAYTTAWTLAMVHGMDPAFSERYYPFRKQTFVEVYDEG
 RKARVRETAGTDDADGGVGLASAFITLLAREMGDQQLFDQLLNHLEPPPAKPSIVSASLRY
 EHPGSLLFDELLFLAKVHAGEGALLRMPPPAAKLAGK

Figura 6

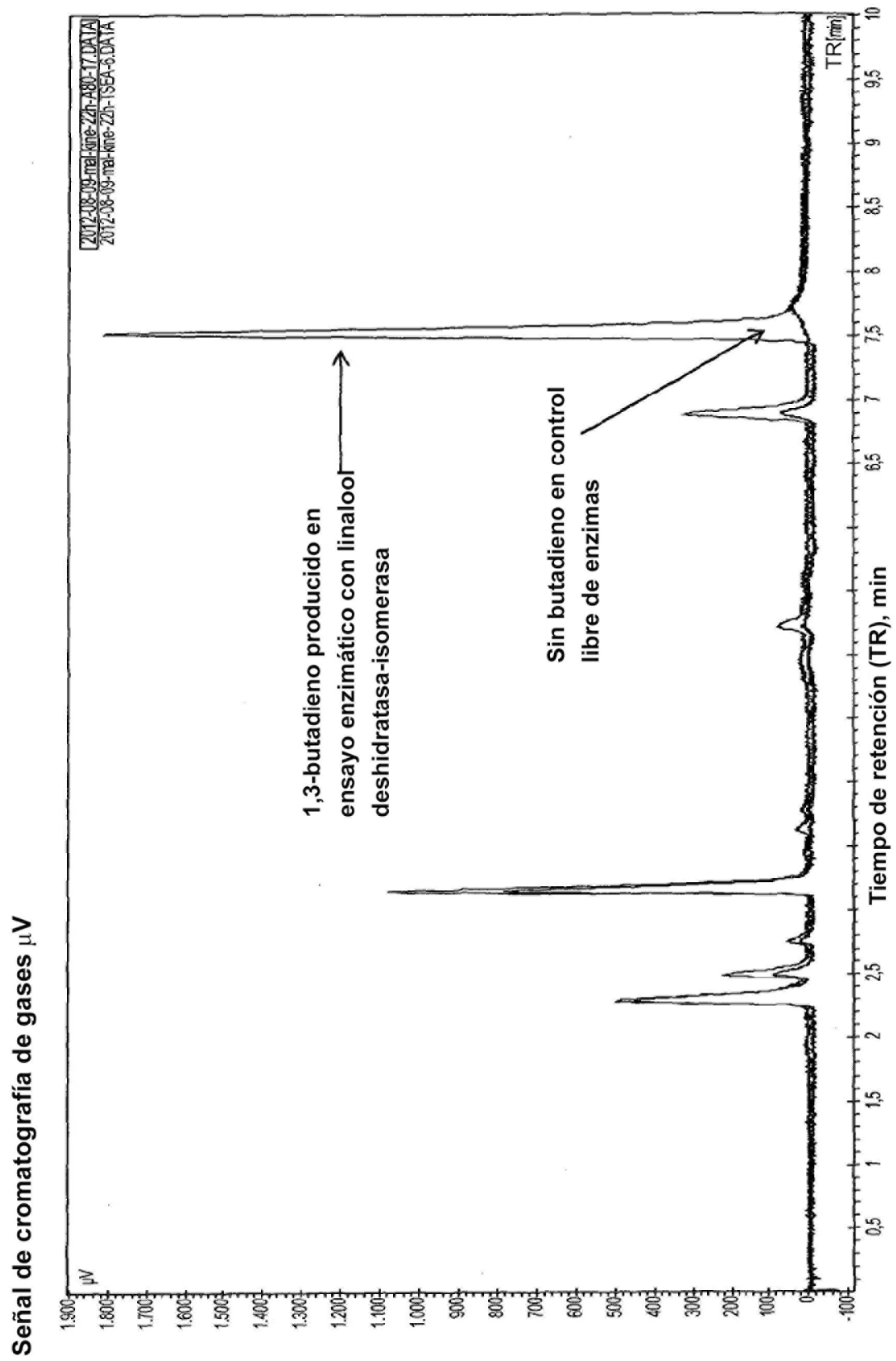


Figura 7

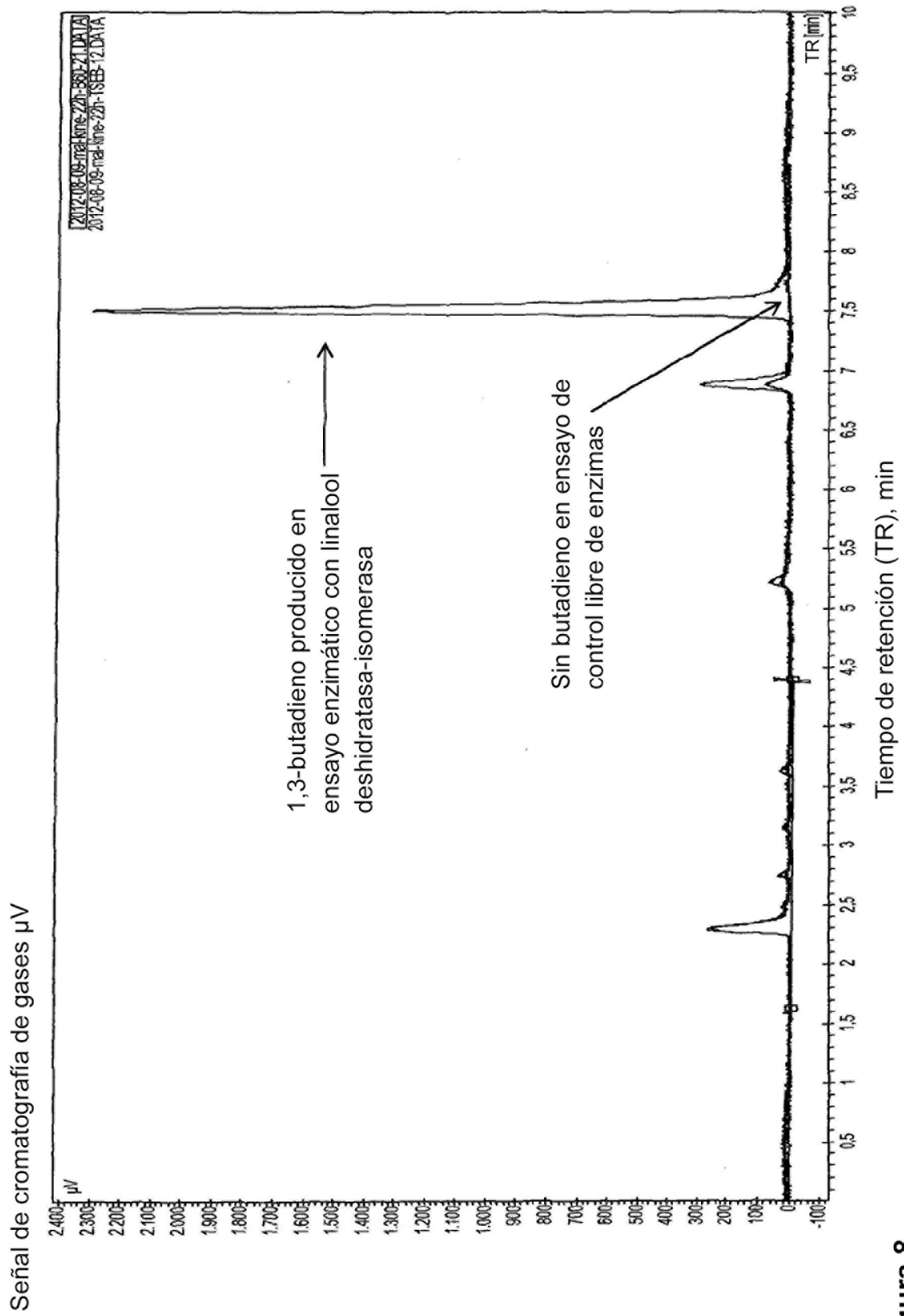


Figura 8

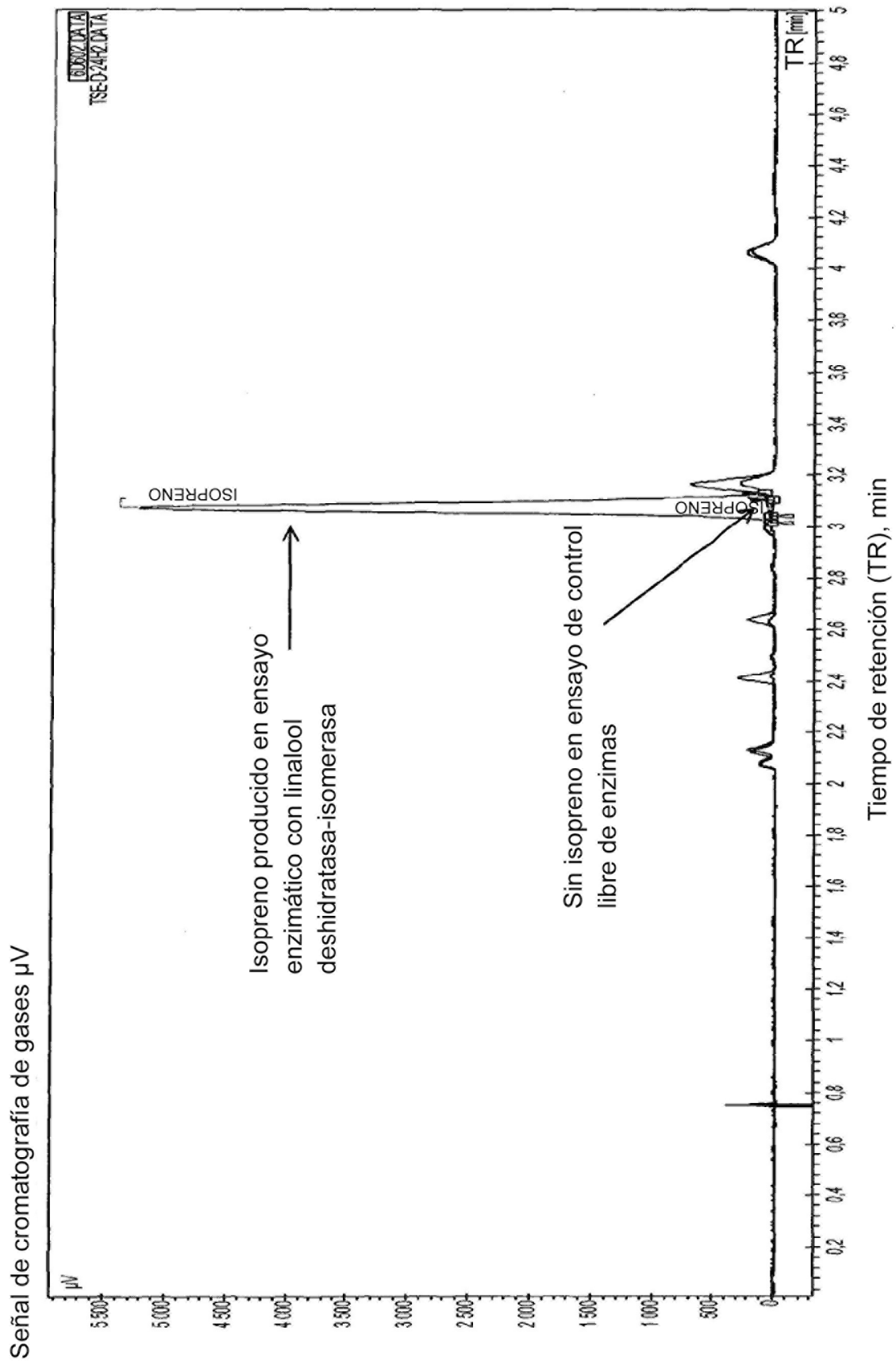


Figura 9

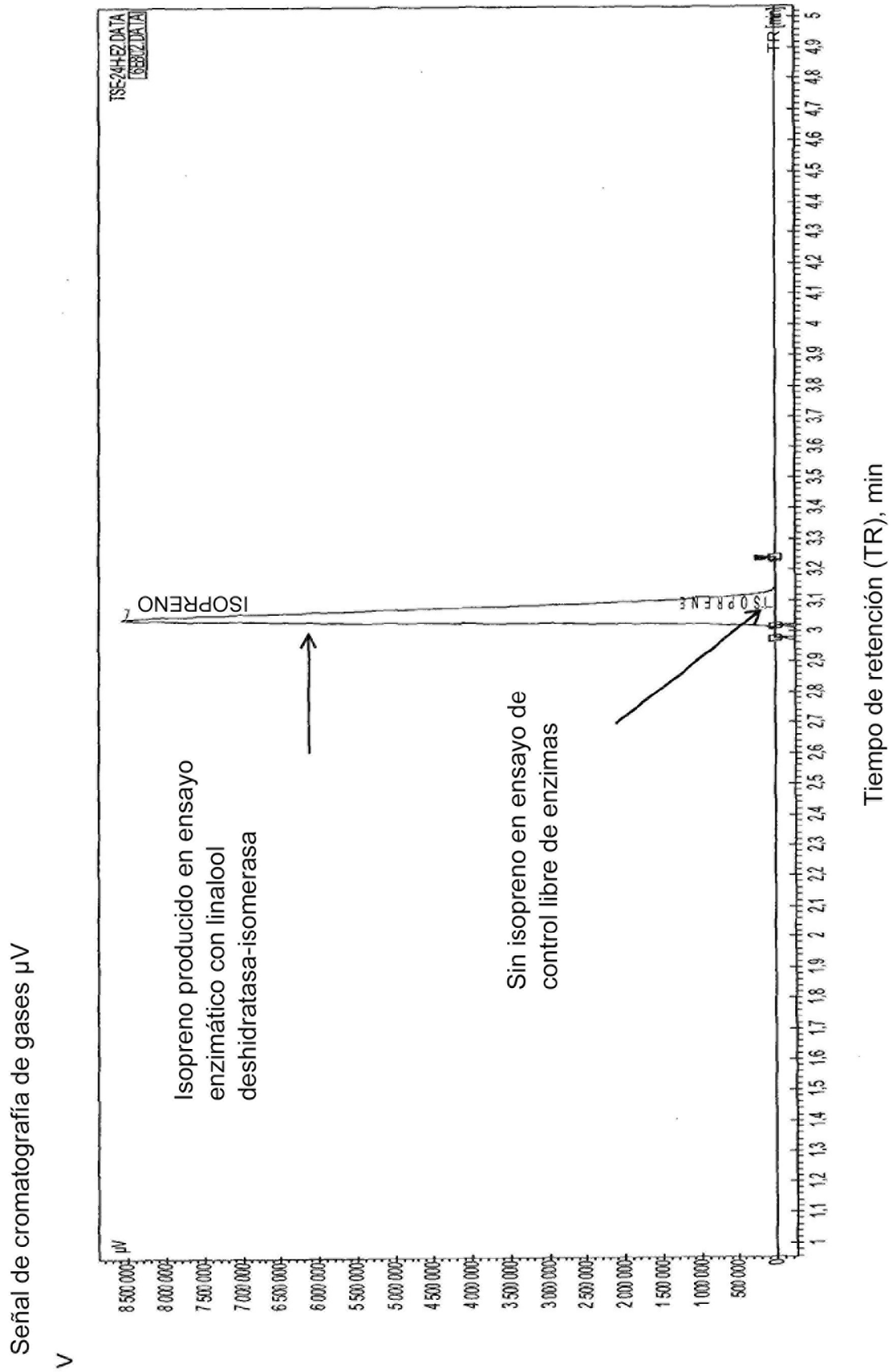


Figura 10

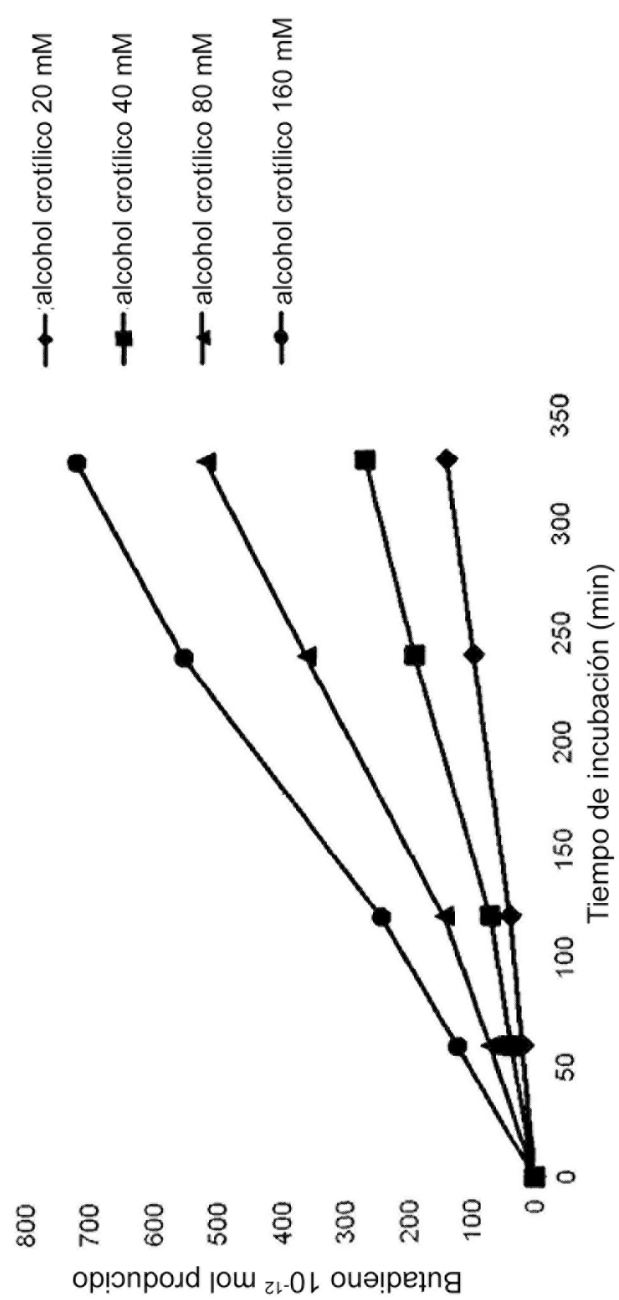


Figura 11

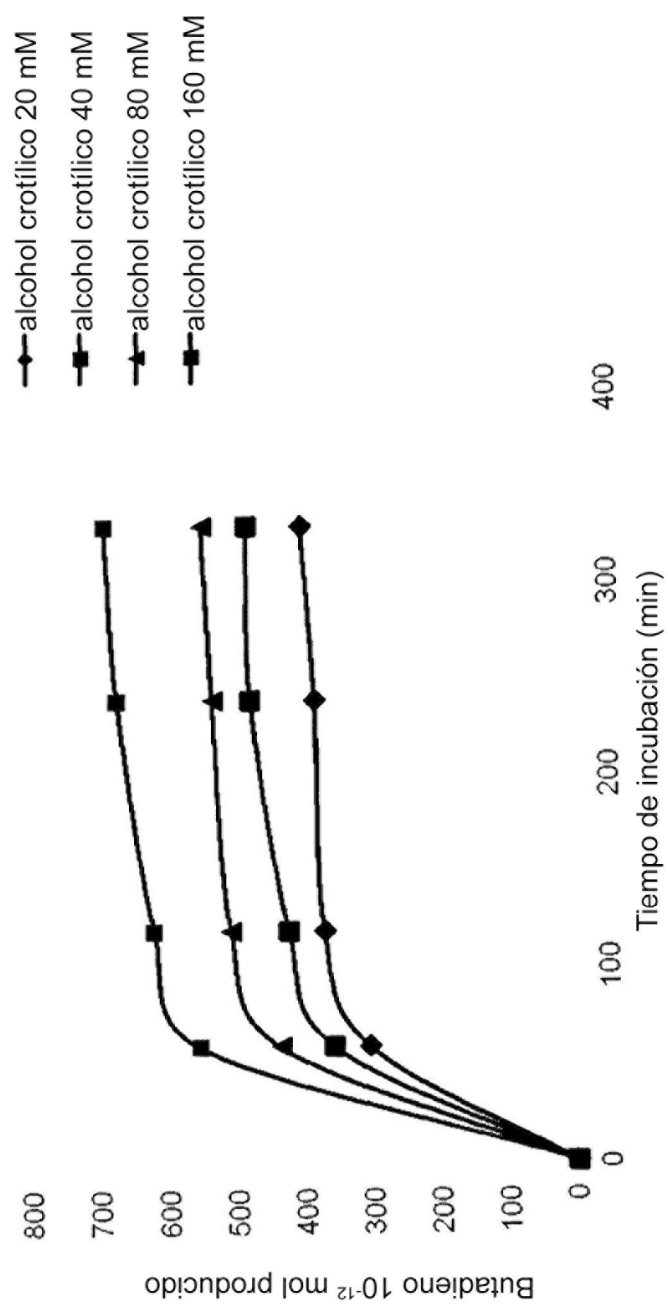


Figura 12

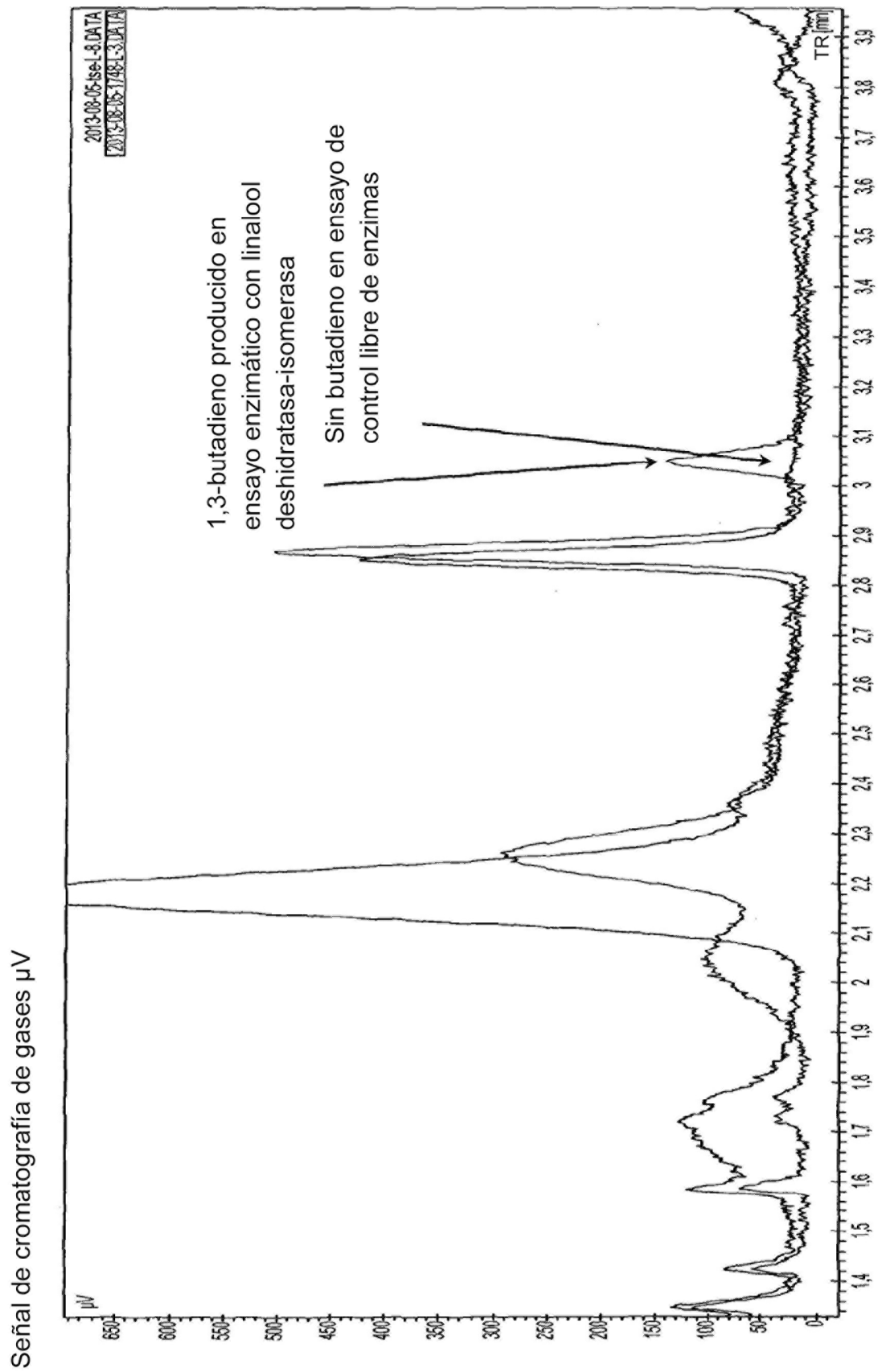


Figura 13

Señal de cromatografía de gases μV

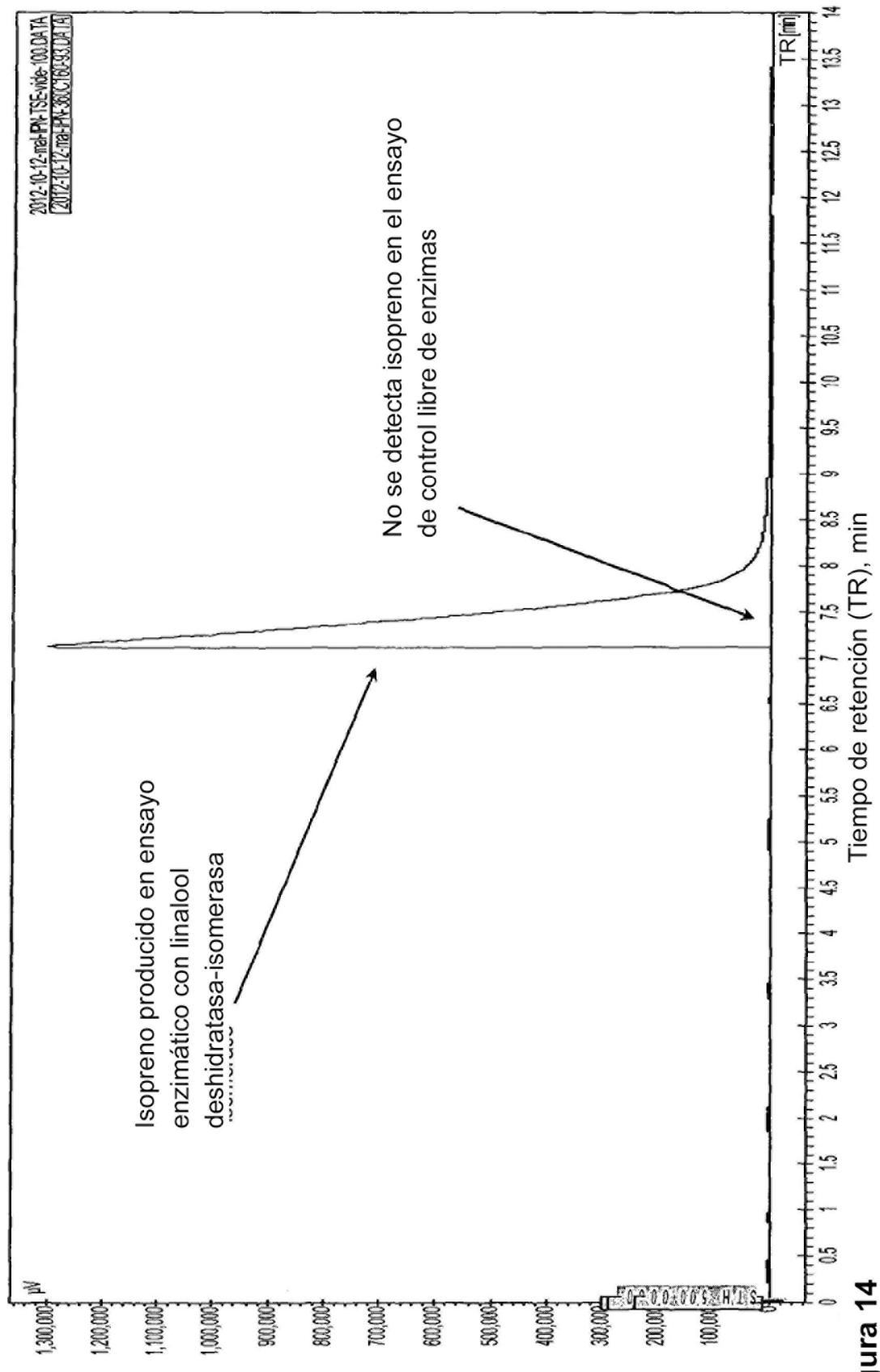


Figura 14

Señal de cromatografía de gases μV

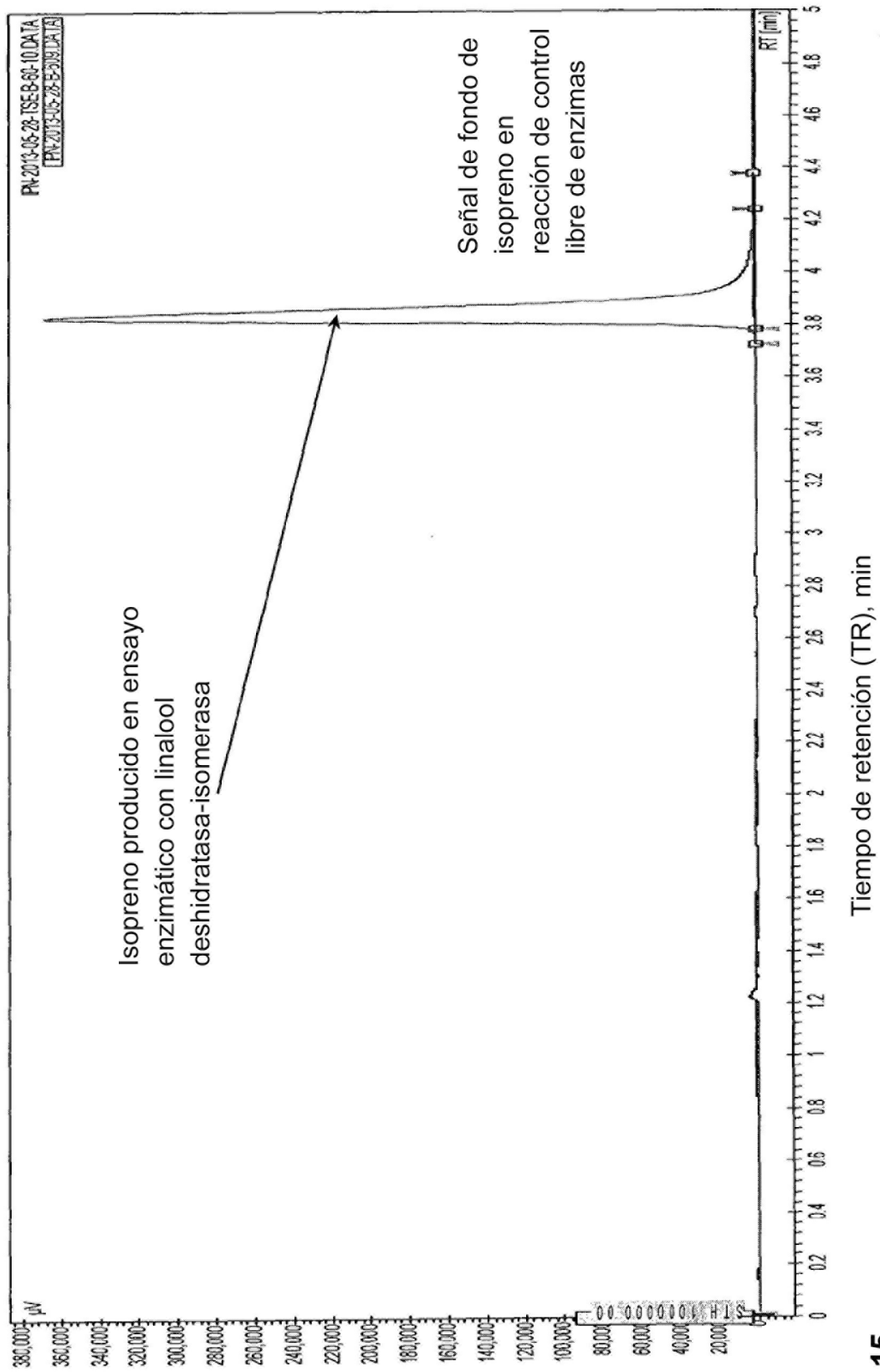


Figura 15

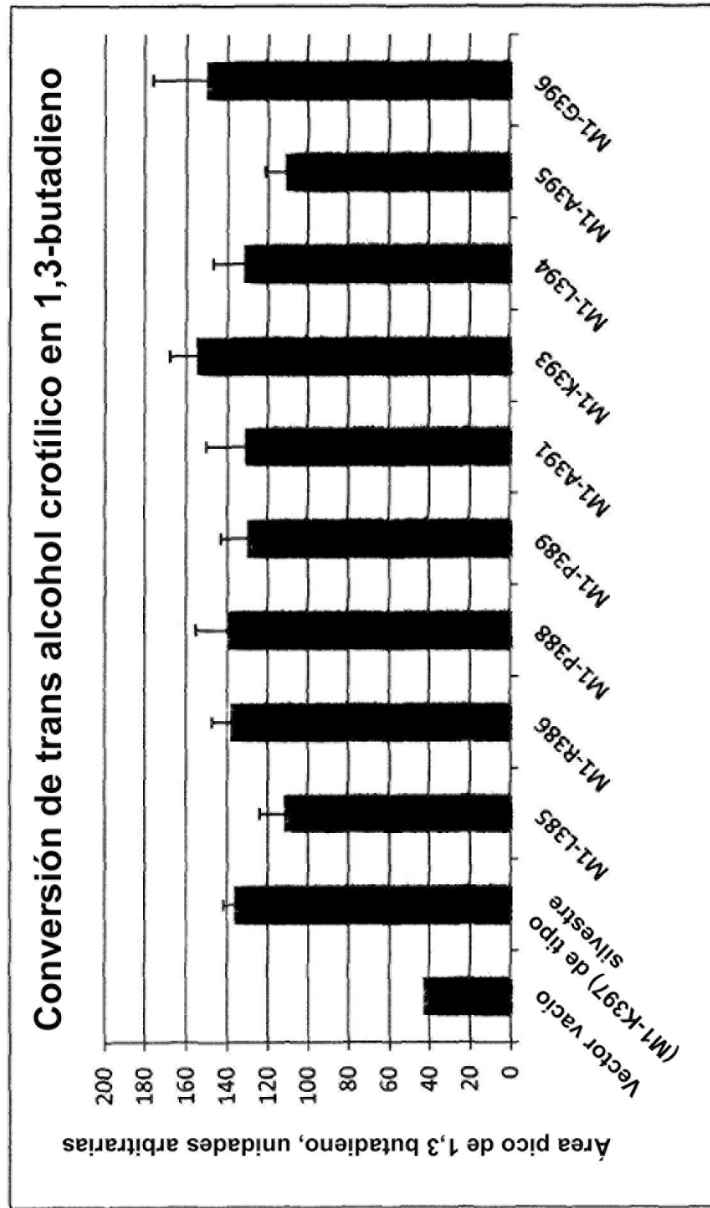


Figura 16

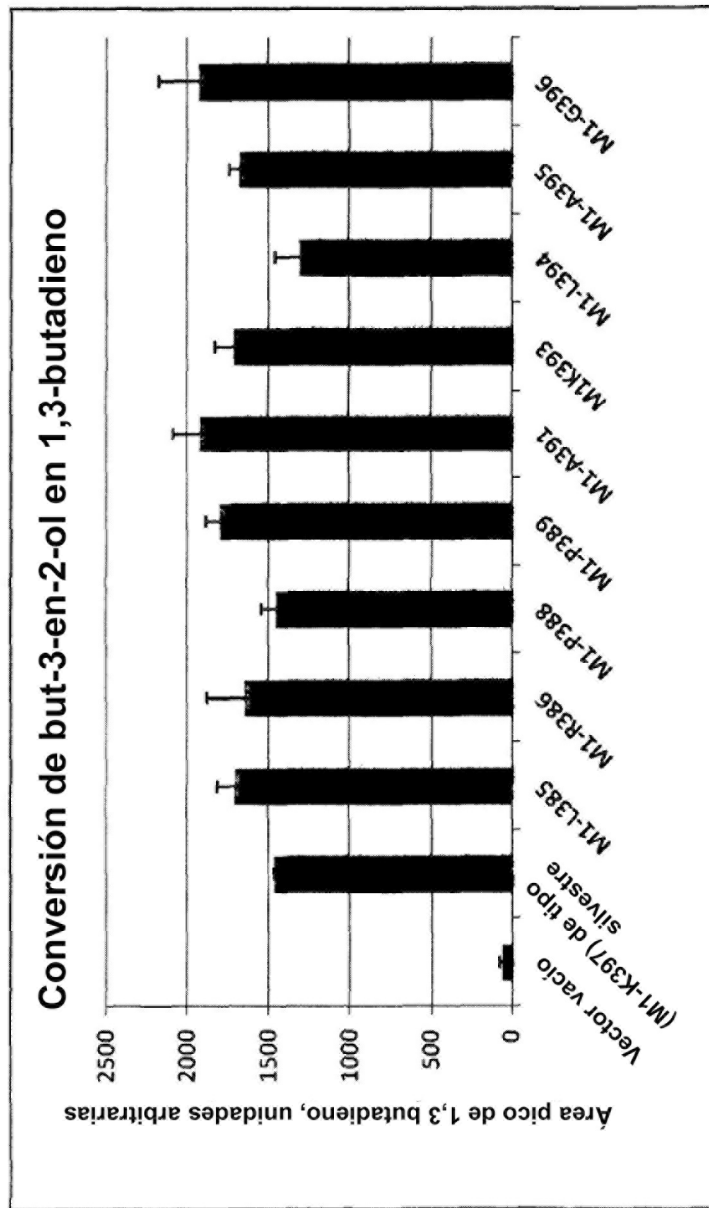


Figura 16 (continuación)

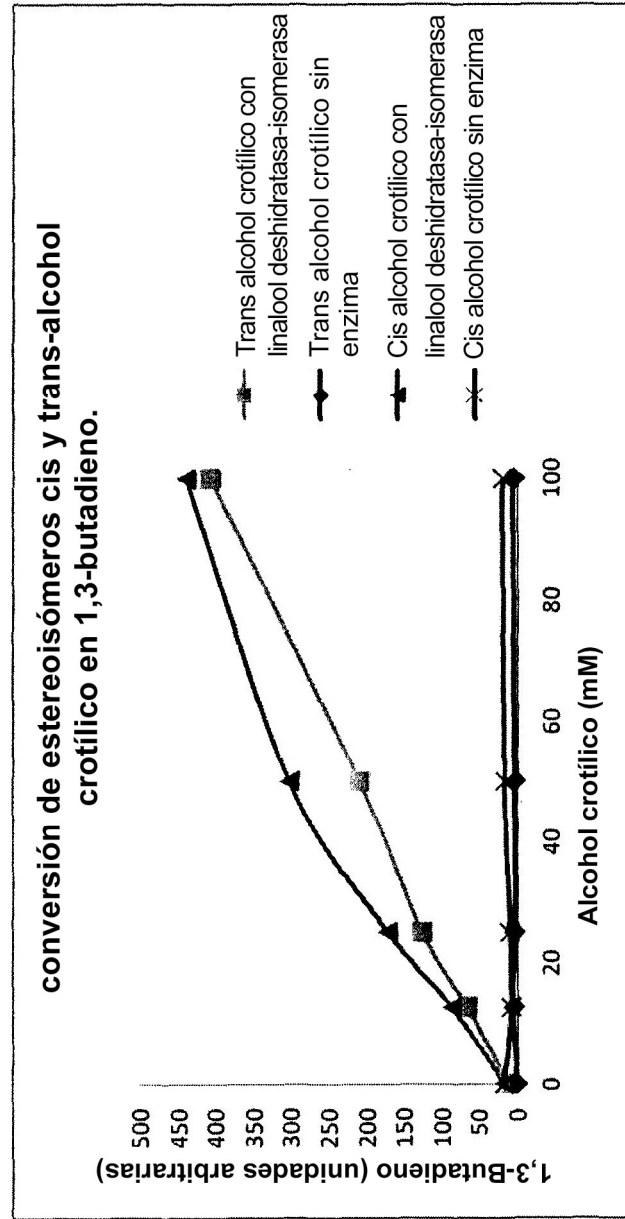


Figura 17