

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 785**

51 Int. Cl.:

C12P 5/02 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12N 15/60 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2009 PCT/FR2009/051332**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2010 WO10001078**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2009 E 09772760 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2304040**

54 Título: **Producción de alquenos mediante descarboxilación enzimática de ácidos 3-hidroxi-alcanoicos**

30 Prioridad:

04.07.2008 FR 0854550
08.07.2008 US 78824 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.12.2017

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

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 647 785 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 alquenos mediante descarboxilación enzimática de ácidos 3-hidroxi-alcanoicos

Introducción

5 La presente invención describe un procedimiento de generación de alquenos por vía biológica. Más concretamente, se refiere a un procedimiento de producción de alquenos terminales (especialmente propileno, etileno, 1-butileno, iso-butileno o iso-amileno) a partir de moléculas de tipo 3-hidroxi-alcanoato.

Antecedentes de la invención

10 De la petroquímica se derivan en la actualidad una gran cantidad de compuestos químicos. Los alquenos (como etileno, propileno, los diferentes butenos, o incluso los pentenos, por ejemplo) se utilizan en la industria del plástico, por ejemplo, para fabricar polipropileno o polietileno, así como en otros ámbitos de la industria química y de los combustibles.

15 El etileno, el alqueno más sencillo, ocupa un lugar central en la química orgánica industrial: es el compuesto orgánico de mayor producción mundial. En particular, permite generar el polietileno, un plástico de primer nivel. Mediante una reacción (de oxidación, de halogenación), también se puede transformar el etileno en muchos productos útiles para la industria. El propileno tiene un papel de importancia comparable: de su polimerización se deriva un material plástico, el polipropileno. Las características de este producto, en lo que respecta a resistencia, densidad, solidez, deformabilidad, transparencia, no tienen equivalente. El mercado mundial del polipropileno se desarrolla constantemente desde su invención en 1954.

20 El butileno existe en cuatro formas, de las que una de ellas, el isobutileno, se requiere en la composición del metil-terc-butil-éter-(MTBE), un aditivo antidetonante para combustibles de automoción. El isobutileno también puede utilizarse para generar isoocteno, que a su vez se puede reducir a isooctano (2,2,4-trimetil-pentano); la elevada relación combustión/explosión del isooctano lo convierte en el mejor combustible para los motores denominados "de gasolina".

25 Amileno, hexeno y hepteno existen en muchas formas dependiendo de la ubicación y configuración de la doble cadena. Estos productos tienen aplicaciones industriales reales, aunque de menor importancia que el etileno, propileno o los butenos.

30 En la actualidad, todos estos alquenos se producen por craqueo catalítico de productos petrolíferos (o con un derivado del proceso Fisher-Tropsch, en el caso del hexano, a partir de carbón o gas). Evidentemente, su coste depende del precio del petróleo. Por otra parte, el craqueo catalítico presenta, a veces, dificultades técnicas importantes, que se traducen en complejidad del procedimiento y en coste de producción.

Independientemente de las consideraciones anteriores, la bioproducción de material plástico ("bioplásticos") ha recibido un impulso importante. El motivo surge de consideraciones económicas relacionadas con el coste del petróleo, y de consideraciones ambientales globales (productos neutros en carbono) o locales (gestión de residuos).

35 La principal familia de bioplásticos es la de los polihidroxialcanoatos (PHA). Se trata de polímeros obtenidos por condensación de moléculas que comprenden simultáneamente un grupo ácido y un grupo alcohol. La condensación se produce por esterificación del ácido sobre el alcohol del monómero siguiente. Este enlace éster no es tan estable como el enlace carbono-carbono directo que se encuentra en los polímeros de plástico convencionales, lo que explica la biodegradabilidad, en un plazo de varias semanas a varios meses, de los PHA.

40 En la familia de los PHA, se pueden citar especialmente el poli-3-hidroxi-butirato (PHB), un polímero de 3-hidroxi-butirato, o el poli-hidroxi-butirato-valerato (PHBV), un polímero que alterna 3-hidroxi-butirato y 3-hidroxi-valerato.

45 El PHB se produce de forma natural por determinadas cepas bacterianas, tales como *Alcaligenes eutrophus* o *Bacillus megaterium*. Se han fabricado bacterias de laboratorio, como *Escherichia coli*, que han incorporado las vías de síntesis que conducen al PHB o a los PHA en general. El compuesto, o su polímero, puede representar, en determinadas condiciones de laboratorio, hasta el 80% de la masa de la bacteria. (Wong MS y col, Biotech. Bioeng 2008). En la década de los 80 del siglo pasado se realizaron tentativas de producción industrial de PHB, pero el coste de su fabricación por fermentación se consideraba en esa fecha demasiado elevado. Se están realizando proyectos de producción directa de estos compuestos en plantas genéticamente modificadas (que han incorporado las enzimas fundamentales de la vía de síntesis del PHB de las bacterias productoras). Podrían asociarse a mejores costes de explotación.

50 La generación por vía biológica de alcanos u otras moléculas orgánicas de utilidad como combustibles o como precursores de resinas sintéticas se impone en el contexto de un aprovechamiento industrial duradero armonizado con los ciclos geoquímicos. La primera generación de biocombustibles consistió en la producción fermentativa de etanol, ya que los procesos de fermentación y destilación ya estaban implantados en la industria agroalimentaria. La producción de biocombustibles de segunda generación se encuentra en una fase de investigación, vinculada especialmente a la producción de alcoholes de cadena larga (butanol y pentanol), terpenos, alcanos lineales y ácidos grasos. Dos revisiones recientes trazan un cuadro general de las investigaciones en este campo: Ladygina N y col., Process Biochemistry 2006 41:1001, y Wackett LP Current Opinion in Chemical Biology, 2008, 21: 187.

Dentro de la familia química de los alquenos, el isopreno (2-metil-1,3-butadieno) es el motivo terpénico cuya polimerización produce caucho. Se podrían desarrollar otros terpenos, por procedimientos químicos, biológicos, o

mixtos, para su uso en productos de utilidad como biocombustibles o para fabricar plásticos. Publicaciones recientes muestran que la ruta del mevalonato (un intermedio fundamental en la biosíntesis de esteroides en numerosos organismos) se podría utilizar para producir eficazmente productos de la familia de los terpenos con rendimientos industriales (Withers ST y col., Appl. Environ Microbiol 2007 73:6277).

- 5 La producción de alquenos terminales (etileno monosustituido o disustituido en posición 2, $H_2C=C(R^1)(R^2)$) aparentemente se ha estudiado menos: se ha detectado la producción de isobutileno a partir de isovalerato mediante la levadura *Rhodotorula minuta*, (Fujii T. y col, Appl. Environ. Microbiol. 1988 54:583), pero la eficacia de esta conversión, inferior a 1 millonésimo por minuto, es decir, de aproximadamente uno por 1000 por día, está lejos de permitir una aplicación industrial. El mecanismo de reacción se ha elucidado en Fukuda H y col., BBRC 1994 201:2:516: interviene una enzima de la familia de los citocromos P450 que lleva a cabo una reacción de descarboxilación del isovalerato, mediante la reducción de un grupo oxoferrilo $Fe^V=O$. En ningún momento, la reacción no utiliza la hidroxilación del isovalerato. Sin embargo, el isovalerato es un compuesto intermedio del catabolismo de la leucina. La biosíntesis masiva de isovalerato por esta ruta parece muy desfavorable, ya que requeriría sintetizar y degradar una molécula de leucina para formar una molécula de isobutileno. Para terminar, la enzima que cataliza la reacción utiliza un grupo hemo como cofactor, que se presta mal a la expresión recombinante en bacterias y a la mejora de los parámetros enzimáticos. Por todos estos motivos, parece poco probable que esta ruta de la técnica anterior pueda servir como base de un despliegue industrial. Se han mencionado otros microorganismos como marginalmente capaces de generar isobutileno de forma natural a partir de isovalerato. Los rendimientos obtenidos son aún más bajos que los obtenidos usando *Rhodotorula minuta* (Fukuda H. y col, Agric. Biol. Chem. 1984 48:1679).

Estos mismos artículos también informan de la producción natural de propileno: numerosos microorganismos pueden producir propileno, con un rendimiento, en este caso, muy bajo.

- La producción de etileno en plantas se ha descrito desde hace mucho tiempo (Meigh y col, 1960 Nature 186:902). La metionina constituye el precursor del etileno según la ruta metabólica elucidada (Adams et Yang, PNAS 1979 76: 170). También se ha notificado la conversión desde 2-oxoglutarato (Ladygina N y col., Process Biochemistry 2006 41:1001). Puesto que una sola molécula de etileno requiere la producción previa de una cadena de cuatro o cinco átomos de carbono, los balances de materia y energía de todas estas vías son desfavorables y no pronostican una buena aplicación industrial para la bioproducción de alquenos.

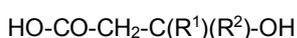
- Previamente a la caracterización de las etapas enzimáticas que, en las plantas, convierten en metileno su verdadero precursor metabólico, la S-adenosil-metionina (SAM), mediante la formación de 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) (Adams et Yang, PNAS 1979 76: 170), se propusieron otras muchas hipótesis en la bibliografía científica para explicar la producción de etileno, entre las que se encuentra la descarboxilación del acrilato ($H_2C=CH-CO_2H$), que provendría de la deshidratación del 3-hidroxi-propionato. Varios artículos especulaban explícitamente acerca de la ruta metabólica que convertiría en etileno, mediante el acrilato, el 3-hidroxi-propionato, para interpretar los experimentos de trazado radiactivo de etileno suministrando sustratos marcados con ^{14}C a preparaciones de tejidos vegetales, beta-alanina-2- ^{14}C , a extractos de cotiledón de judías (Stinson y Spencer, Plant Physiol., 1969, 44:1217; Thompson y Spencer, Nature 1966, 210:5036), y propionato-2- ^{14}C a homogenatos de pulpa de plátano. (Shimokawa et Kasai, Agr. Biol. Chem. 1970 34:11:1640). Todas estas especulaciones sobre la participación de 3-hidroxi-propionato y de acrilato en la producción metabólica de etileno, que no habían conducido a la caracterización de actividades enzimáticas, desaparecieron de la bibliografía científica desde el descubrimiento del papel de metionina, SAM y ACC (Hanson et Kende, Plant Physiology 1976 57:528; Adams et Yang, PNAS 1979 76: 170).

- Por tanto, no existe en la actualidad, según el conocimiento de los inventores, ningún procedimiento eficaz para producir mediante síntesis microbiológica alcanos terminales tales como etileno, propileno, 1-butileno, isobutileno, 1-amileno o isoamileno. Un procedimiento de ese tipo permitiría evitar el consumo de productos derivados del petróleo, y reducir los costes de producción de materiales plástico y combustible. Para terminar, en su caso, podría evitar un efecto global importante sobre el medio ambiente, ya que permitiría almacenar carbono en forma sólida.

Sumario de invención

La presente invención describe un procedimiento que permite realizar la síntesis de compuestos alquenos de forma biológica.

- 50 La invención se deriva de la concepción de una nueva ruta de síntesis de compuestos alcano terminales que se basa en la conversión de 3-hidroxi-alcanoatos de la fórmula



- en la que R^1 y R^2 se seleccionan, independientemente, entre un átomo de hidrógeno, un resto metilo y un resto etilo. La invención también se basa en la demostración de que esta conversión se puede realizar de forma biológica, utilizando una enzima de tipo mevalonato difosfato decarboxilasa o variantes de la misma. La invención se puede llevar a cabo *in vitro*, en sistemas acelulares, o usando microorganismos. La invención se refiere igualmente a la producción de alquenos a partir de una fuente de carbono y, especialmente, un hidrato de carbono (especialmente, glucosa), un poliol (especialmente glicerol), un polímero biodegradable (especialmente almidón, celulosa, poli-3-

hidroxi-alcanoato); transformándose la fuente de carbono, mediante un microorganismo, en un intermedio metabólico de la familia de los 3-hidroxi-alcanoatos, que a su vez se convierte en un alqueno terminal.

Más concretamente, un objeto de la invención es un procedimiento de producción de un alqueno terminal, caracterizado porque comprende una etapa de conversión de un 3-hidroxi-alcanoato mediante una enzima que tiene actividad mevalonato difosfato descarboxilasa, en el que el 3-hidroxi-alcanoato es un compuesto de la fórmula HO-CO-CH₂-C(R¹)(R²)-OH o O-CO-CH₂-C(R¹)(R²)-OH en la que R¹ y R² se seleccionan, independientemente, entre un átomo de hidrógeno, un resto metilo y un resto etilo, y en el que la conversión se realiza en presencia de un cosustrato, siendo dicho cosustrato ATP, un rNTP, un dNTP o una mezcla de varias de estas moléculas, un polifosfato, o pirofosfato.

En consecuencia, la presente invención se refiere al uso de compuestos de 3-hidroxi-alcanoato, como compuesto precursor o sustrato, en la producción de compuestos alcanos terminales.

En las realizaciones particulares de la invención:

- el 3-hidroxi-propionato se convierte en metileno; o
- el 3-hidroxi-butinato se convierte en propileno; o
- el 3-hidroxi-valerato se convierte en 1-butileno; o
- el 3-hidroxi-3-metil-butirato (o 3-hidroxi-isovalerato) se convierte en isobutileno; o
- el 3-hidroxi-3-metil-valerato se convierte en isoamileno.

La invención se refiere además al uso de una enzima mevalonato difosfato descarboxilasa, o de un microorganismo que produce una mevalonato difosfato descarboxilasa, en la producción de compuestos alcanos terminales a partir de los 3-hidroxi-alcanoatos como se han definido anteriormente.

La invención también se refiere a una composición que comprende un microorganismo que produce una mevalonato difosfato descarboxilasa, un medio de cultivo adecuado, y un compuesto de 3-hidroxi-alcanoato como se ha definido anteriormente.

La enzima que tiene una actividad mevalonato difosfato descarboxilasa puede ser una enzima que comprende todo o parte de la secuencia SEQ ID NO: 6 o una enzima que tiene una homología de secuencia de al menos un 15% con esta.

La invención también se refiere al uso de una enzima que tenga una actividad mevalonato difosfato descarboxilasa, y que comprende todo o parte de la SEQ ID NO: 6, o de una enzima que presenta una homología de secuencia de al menos un 15% con esta, para producir un alqueno terminal como se ha definido anteriormente.

También se describe un procedimiento de producción de una enzima que tiene una actividad mevalonato difosfato descarboxilasa, y que comprende todo o parte de la SEQ ID NO: 6 o de una enzima que presenta una homología de secuencia de al menos un 15% con esta, comprendiendo el procedimiento el cultivo de un microorganismo formado por un ácido nucleico recombinante que codifica dicha secuencia en las condiciones que permite la expresión de dicha secuencia.

También se describe un microorganismo que comprende un ácido nucleico recombinante que codifica una enzima que tiene una actividad descarboxilasa y que comprende todo o parte de la SEQ ID NO: 6 o una enzima que tiene una homología de secuencia de al menos un 15% con esta.

Definiciones

Por "3-hidroxi-alcanoato", se entienden moléculas que comprenden, como motivo común, el 3-hidroxi-propionato (figura 1), y opcionalmente uno o dos sustituciones alcoilo en el carbono 3. Estos restos o radicales alcoilo pueden ser lineales o ramificados. En la presente solicitud, los términos "alcoilo" y "alquilo" tienen el mismo significado y se usan indistintamente. Asimismo, los términos "resto" y "radical" tienen el mismo significado y se usan indistintamente. Los restos metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo son ejemplos de estos residuos alcoilo. El carbono 3 se convierte en un centro quiral si los dos sustituyentes alcoilo son diferentes. La presente definición abarca las dos formas quirales, incluso aunque una de las dos formas, por ejemplo, la forma R, sea la forma principal que se produce naturalmente. En la figura 3 se muestran ejemplos de 3-hidroxi-alcanoatos. Opcionalmente, se pueden añadir sustituyentes alcoilo al carbono 2, que tiene también ahora la posibilidad de convertirse en quiral (si los dos sustituyentes son diferentes). Indistintamente, las configuraciones de los sustratos 3-hidroxi alcanoatos de la presente invención abarcan la totalidad de estereoisómeros. Los 3-hidroxi-alcanoatos correspondientes bien al 3-hidroxi-propionato o bien a las variantes o derivados de 3-hidroxi-propionato en los que uno de los dos o los dos átomos de hidrógeno que tiene el carbono 3 están sustituidos por un motivo compuesto solamente por átomos de carbono y de hidrógeno, estando comprendido el número de átomos de carbono de estos sustituyentes de 1 a 5, preferentemente de 1 a 3, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo o isobutilo. El sufijo "oato" puede significar aquí indistintamente tanto el ion carboxilato (COO⁻) como el ácido carboxílico (COOH). No se utiliza para designar un éster.

Los 3-hidroxi-alcanoatos utilizados en el procedimiento de acuerdo con la invención son los compuestos de la fórmula siguiente: HO-CO-CH₂-C(R¹)(R²)-OH o O-CO-CH₂-C(R¹)(R²)-OH en la que R¹ y R² se seleccionan, independientemente, entre un átomo de hidrógeno, un resto metilo y un resto etilo.

5 Por "alquenos terminales", se entiende, en el sentido de la presente invención, moléculas compuestas solamente por carbono e hidrógeno (hidrocarburos insaturados de fórmula C_nH_{2n}) que comprenden etileno y moléculas orgánicas derivadas de etileno por monosustitución o disustitución de los dos átomos de hidrógeno unidos al carbono 2 por radicales alcoílo, lineales o ramificados. Los alquenos terminales tienen la fórmula H₂C=C(R¹)(R²) en la que R¹ y R² se seleccionan, independientemente, entre un átomo de hidrógeno y un radical alcoílo, lineal o ramificado, que tenga por ejemplo de 1 a 4 átomos de carbono, o de 1 a 3 átomos de carbono. El al menos uno de los dos sustituyentes del carbono 2 del alqueno puede ser un radical alcoílo lineal o ramificado. Los alcanos terminales comprenden los compuestos isoalquenos ramificados, como por ejemplo iso-butileno. Un alqueno terminal, que es el producto de un procedimiento de acuerdo con la invención, es un compuesto de fórmula H₂C=C(R¹)(R²) en la que R¹ et R² se seleccionan, independientemente, entre un átomo de hidrógeno, un resto metilo y un resto etilo. Los ejemplos preferidos de compuestos alcanos terminales de acuerdo con la invención son, especialmente, etileno, propileno, iso-butileno, e iso-amileno (figura 4), o también 1-butileno y 1-amileno.

"Fuente de carbono" designa, en la presente memoria, cualquier compuesto de carbono de utilidad como sustrato para los organismos de acuerdo con la invención. Dicho término abarca glucosa o cualquier otra hexosa, xilosa o cualquier otra pentosa, polioles como glicerol, sorbitol o manitol, o también polímeros tales como almidón, celulosa o hemicelulosa, o también poli-3-hidroxi-alcanoatos como poli-3-hidroxi-butilato. Puede tratarse de cualquier sustrato que permita el crecimiento de microorganismos, como por ejemplo, formiato. También se puede tratar de CO₂ en el caso en que el organismo sea capaz de realizar la fotosíntesis.

Por «recombinante», en la presente memoria, se designa la modificación artificial de un organismo, tanto por adición, sustracción o modificación de un gen cromosómico o extracromosómico o de un motivo de regulación tal como un promotor, bien por fusión de organismos, bien por adición de un vector del tipo que sea, por ejemplo, plasmídico. La "expresión recombinante" designa la producción de una proteína que implica una modificación genética, preferentemente para producir una proteína de origen extraño o heteróloga con respecto a su hospedador, es decir, que no aparece de forma natural en el hospedador de producción, o para producir una proteína endógena modificada o mutada.

Por "expresión en exceso" o "que expresa en exceso", en la presente memoria, se designa la expresión recombinante de una proteína, preferentemente procedente de un organismo diferente del que se expresa, aumentada al menos un 10% y preferentemente un 20%, 50%, 100%, 500% u opcionalmente más con respecto a la expresión natural de dicha proteína. También se incluye en el marco de esta definición el caso donde no haya expresión natural de dicha proteína.

Un "cosustrato" es un producto añadido a la reacción enzimática, de forma que mejoren algunos parámetros de la misma y, en primer lugar, su actividad, donde dicho producto y el sustrato principal se consumen en cantidades iguales. Por tanto, el cosustrato debe añadirse a la reacción en una concentración similar a la del sustrato principal. Dependiendo de la enzima, puede ser necesaria la presencia de un cosustrato para la reacción enzimática.

Un "cofactor" es un producto añadido a la reacción enzimática, de forma que mejoren algunos parámetros de la misma y, en primer lugar, su actividad, donde dicho producto no se consume durante la reacción, y por tanto, solamente debe añadirse a baja concentración, proporcional a la cantidad de enzima, denominándose por tanto dicha concentración como "catalítica".

Una "parte" de una secuencia de aminoácidos designa un fragmento que comprende al menos 10, preferentemente al menos 20, 30, 40 o 50 restos de aminoácidos consecutivos de dicha secuencia.

Por "homología", se entiende la existencia de una similitud entre dos secuencias según se determina por el porcentaje de identidad entre dichas dos secuencias.

Los compuestos químicos se conocen frecuentemente con varios nombres, tanto oficiales como de uso habitual. En la presente memoria, se prefieren los nombres habituales de las moléculas. Así:

- "etileno" se usa para designar el eteno
- "propileno" se usa para designar el propeno
- 50 - "butileno" se usa para designar el buteno
- "isobutileno" se usa para designar el 2-metil-propeno o isobuteno
- "amileno" se usa para designar el penteno
- "isoamileno" se usa para designar el 2-metil-but-1-eno o isopenteno
- "propionato" se usa para designar el ácido propanoico o el ion propanoato
- 55 - "butirato" se usa para designar el ácido butanoico o el ion butanoato
- "valerato" se usa para designar el ácido pantanoico o el ion pantanoato

Descripción detallada de la invención

5 La invención describe especialmente un procedimiento de producción de alquenos terminales que comprende una etapa de descarboxilación enzimática de compuestos 3-hidroxi-alcanoatos como se han definido anteriormente. La invención se deriva también de la utilización de descarboxilasas del tipo mevalonato difosfato descarboxilasa para catalizar esta reacción, y sustratos tales como 3-hidroxi-butilato, 3-hidroxi-valerato, 3-hidroxi-3-metil-butirato (o 3-hidroxi-isovalerato) y 3-hidroxi-propionato. La invención describe el uso de cofactores, tales como difosfato de etilo, difosfato de propilo, difosfato de metilo, análogos de estas moléculas, y pirofosfato. La invención describe también el uso de cosustratos, como el ATP u otros compuestos que incluyen un enlace fosfoanhídrido, como se ha definido anteriormente.

10 La invención se refiere también al uso de fuentes de carbono, como glucosa, para producir directamente los alcanos terminales a partir de células completas, pasando la ruta de síntesis por los 3-hidroxi-alcanoatos como se han definido anteriormente.

15 La invención se refiere también a microorganismos o plantas, naturales o modificados, que producen de forma endógena un 3-hidroxi-alcanoato como se ha definido anteriormente, y que por tanto expresan una mevalonato difosfato descarboxilasa transformando dichos 3-hidroxi-alcanoatos en alcanos terminales. Los compuestos alquenos producidos, especialmente propileno, etileno e isobutileno, son moléculas clave en la industria de los plásticos y combustibles, y su fabricación industrial por procedimientos biológicos, a partir de recursos renovables, constituye una innovación muy importante.

20 La invención se deriva, por tanto, de la concepción de una nueva ruta de síntesis de compuestos de tipo alqueno terminal basada en la conversión de compuestos de tipo 3-hidroxi-alcanoato como se han definido anteriormente. La invención demuestra que esta conversión se puede realizar de forma biológica, utilizando una enzima de tipo mevalonato difosfato descarboxilasa, que permite transformar un 3-hidroxi-alcanoato como se ha definido anteriormente en un alqueno terminal. Como se ilustra en la figura 2, esta conversión se realiza mediante un intermedio de reacción de estructura 3-fosfo-hidroxi-alcanoato.

25 La etapa de conversión de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo *in vitro*, en presencia de una enzima asilada (o de un sistema enzimático que comprende, además, uno o varios cofactores) o en cultivo, en presencia de un microorganismo que produce la enzima.

30 Como se describe en la presente memoria, en el ejemplo 5, pudo observarse una relación señal a ruido de fondo (medido en ausencia de enzima) de la tasa de conversión en un factor de aproximadamente 100 en determinadas condiciones. La afinidad con respecto al 3-hidroxi-isovalerato (HIV) se midió con un resultado de aproximadamente 40 mM. No era evidente que una actividad enzimática de ese tipo, muy significativa, hubiera podido obtenerse: es decir, es bien conocido de los bioquímicos conocedores de la teoría y práctica de la enzimología que los sitios activos de las enzimas contienen elementos estructurales que permiten el reconocimiento, la unión y la conversión química de determinados sustratos específicos. La bibliografía científica rebosa de datos experimentales que indican que las modificaciones en el tamaño o en la carga eléctrica, aunque sean poco importantes, son criterios de exclusión para los sustratos. Específicamente, ninguna predicción científica podía prever que las MDP-descarboxilasas podrían utilizar las moléculas del tipo 3-hidroxi-alcanoato como sustrato en general, y en particular el 3-hidroxi-isovalerato, puesto que este difiere del mevalonato-difosfato no solo en su tamaño (PM de 118 contra 308 para el mevalonato difosfato) sino también por las cargas electrostáticas del grupo difosfato presente en el sustrato natural, el mevalonato-difosfato.

40 En una realización particular, se añade un cofactor a la reacción, con el fin de conseguir una complementariedad estérica o electrónica en la bolsa catalítica. El cofactor se selecciona ventajosamente entre el ion pirofosfato, el metil-difosfato, el etil-difosfato, o el propil-difosfato. De manera más general, el cofactor es un compuesto que contiene el motivo fosfoanhídrido, de fórmula general $R-O-PO_2H-O-PO_3H_2$ en la que R es, especialmente, un átomo de hidrógeno, un resto alcoilo, lineal, ramificado o cíclico, preferentemente de 1 a 10 o de 1 a 5 átomos de carbono, o cualquier otro radical orgánico monovalente. Los motivos análogos correspondientes a los monoésteres de difosfonato de metileno, de fórmula general $R-O-PO_2H-CH_2-PO_3H_2$, en los que el fosfoanhídrido está sustituido por un puente metileno que tiene la ventaja de no hidrolizarse, también forman parte de la invención.

45 La conversión se realiza en presencia de un cosustrato, siendo dicho cosustrato ATP, un rNTP, un dNTP o una mezcla de varias de estas moléculas, un polifosfato, o pirofosfato. El cosustrato suele estar presente en el hospedador. No obstante, en otra realización particular, se puede añadir un cosustrato a la reacción, seleccionado entre ATP, un rNTP, un dNTP, una mezcla de varios rNTP o dNTP, un polifosfato y, preferentemente, pirofosfato.

50 En una forma de aplicación en particular de la invención, se utiliza un microorganismo que produce la mevalonato difosfato descarboxilasa. En una realización preferida, el microorganismo es recombinante en el sentido de que produce una mevalonato difosfato descarboxilasa heteróloga con respecto al hospedador de producción. De esta forma, el procedimiento puede llevarse a cabo directamente en el medio de cultivo, sin que sea necesario separar o purificar el sistema enzimático. De manera particularmente ventajosa, se utiliza un microorganismo que tenga la propiedad natural o artificial de producir uno o varios 3-hidroxi-alcanoatos como se han definido anteriormente de

forma endógena, y expresando o expresando en exceso, además, una mevalonato difosfato descarboxilasa, natural o modificada, para producir alcanos terminales directamente a partir de una fuente de carbono presente en la solución.

5 Los microorganismos utilizados en la invención pueden ser procariotas o eucariotas, y especialmente bacterias, levaduras, células vegetales, hongos y mohos, células animales. En una realización particular, los microorganismos son bacterias, especialmente la cepa *Alcaligenes eutrophus* o *Bacillus megaterium*.

En otra realización particular, los microorganismos son bacterias recombinantes de la cepa *Escherichia coli* que se han modificado para producir de manera endógena uno o varios 3-hidroxi-alcanoatos como se han definido anteriormente, y convertirlos en alcanos terminales.

10 En otra realización particular, los microorganismos son levaduras recombinantes, que producen 3-hidroxi-alcanoatos como se han definido anteriormente, y los convierten en alcanos terminales.

15 En otra realización particular, se utiliza un microorganismo productor de uno o varios 3-hidroxi-alcanoatos como se han definido anteriormente por una parte, y una mevalonato difosfato descarboxilasa, opcionalmente expresada por un segundo microorganismo, por otra parte. Opcionalmente, en el procedimiento de acuerdo con la invención, ambos microorganismos se cultivan y utilizan al mismo tiempo.

En otra realización particular, plantas completas que expresan una mevalonato difosfato descarboxilasa, opcionalmente modificadas por transgénesis, se utilizan para producir alcanos terminales a partir de 3-hidroxi-alcanoatos como se ha definido anteriormente, ya se produzcan estos de forma endógena o sean aportes de materia exógena.

20 En otra forma de aplicación en particular, se utiliza un microorganismo fotosintético que tenga la propiedad natural o artificial de producir uno o varios 3-hidroxi-alcanoatos como se han definido anteriormente de forma endógena, y expresando en exceso, además, una mevalonato difosfato descarboxilasa, natural o modificada, para producir alcanos terminales directamente, a partir de CO₂ presente en solución. Preferentemente, el microorganismo es una bacteria fotosintética, o una microalga.

25 Las plantas y los microorganismos anteriormente descritos representan otros objetos de la presente invención, así como su uso en la producción de compuestos alcanos terminales.

Como se describirá en lo sucesivo, el procedimiento de la invención se puede realizar en microaerofilia.

Por otra parte, en una realización preferida, el procedimiento se lleva a cabo en presencia de un sistema de recogida de gases de los alcanos terminales que se desprenden de la reacción.

30 La descarboxilasa utilizada en un procedimiento de la invención es un representante de la superfamilia filogenética de la mevalonato-difosfato (MDP) descarboxilasa (nomenclatura enzimática EC 4.1.1.33), es decir, una enzima, natural o artificial, especificada por un gen, natural o sintético, en su caso capaz de catalizar la reacción presentada en la figura 2. Como se ilustra en la figura 2, el procedimiento de la invención se realiza mediante un intermedio de reacción 3-fosfo-hidroxi-alcanoato, y la enzima aplicada presenta una actividad descarboxilasa y una actividad fosforilasa.

35 La MDP descarboxilasa es una enzima implicada en la biosíntesis de colesterol. Esta enzima se ha aislado a partir de diferentes organismos, tales como animales, hongos, levaduras, y determinadas bacterias. También podría expresarse en determinadas plantas (Lalitha y col, 1985). Se han clonado y secuenciado numerosos genes que especifican esta enzima. Estas enzimas están generalmente compuestas por 300 a 400 aminoácidos, y utilizan el ATP como cosustrato, que se transforma durante la reacción en ADP y en fosfato inorgánico. El grupo fosfato se transfiere desde la molécula de ATP al alcohol terciario del mevalonato difosfato liberando ADP. El intermedio de reacción fosforilado en el grupo 3-hidroxilo experimenta a continuación una eliminación del grupo fosfato, liberando, en el caso fisiológico isopentenil-pirofosfato (figura 2).

45 La estructura tridimensional de varias enzimas de esta familia se ha resuelto. Hasta el momento, se ha realizado poca investigación sobre las enzimas de esta familia, que se han estudiado únicamente en el marco de la descripción precisa de la ruta de biosíntesis del colesterol. Por el contrario, según el conocimiento de los inventores, aún no se ha realizado ningún estudio para desviar esta enzima de su función natural y convertirla en un catalizador industrial.

50 Varios ejemplos de MDP descarboxilasas procedentes de diferentes organismos se proporcionan en las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 16.

De este modo, en una realización preferida, la enzima aplicada es una descarboxilasa, que comprende, preferentemente, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 o una secuencia que presenta al menos un 15% de homología de secuencia con una de estas, y que conserva una actividad descarboxilasa. Las enzimas preferidas incluyen, ventajosamente, al menos un 50% de

homología de secuencia, preferentemente al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, aún más preferentemente, al menos un 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de homología de secuencia con una de las secuencias primarias SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16. El grado de homología de secuencia se puede determinar por diferentes procedimientos y mediante programas informáticos conocidos del experto en la técnica, como por ejemplo, según el procedimiento CLUSTAL o los programas informáticos BLAST o derivados, o utilizando un algoritmo de comparación de secuencias como el de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 1970 48:443) o de Smith et Waterman (J. Mol. Biol. 1981 147:195).

Una descarboxilasa preferida de la invención se representa por la enzima de la secuencia SEQ ID NO: 6, así como cualquier enzima que presente una homología de secuencia significativa con la anterior. Las enzimas preferidas incluyen, ventajosamente, al menos un 50% de homología de secuencia, preferentemente al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, aún más preferentemente, al menos un 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de homología de secuencia con la secuencia primaria SEQ ID NO: 6. Esta enzima se ha clonado de *Picrophilus torridus* y se ha producido de forma recombinante en el marco de la presente invención. Como se ilustra en los ejemplos, esta enzima es especialmente eficaz para producir los compuestos alcanos terminales de acuerdo con la presente invención. En concreto, un objeto de la invención es el uso de una enzima descarboxilasa que comprende todo o parte de la SEQ ID NO:6 o de una enzima que tenga una homología de secuencia significativa y, preferentemente, de al menos un 15% con la SEQ ID NO:6, en la producción de compuestos alcanos terminales a partir de los 3-hidroxi-alcanoatos como se han definido anteriormente. Por homología de secuencia significativa, se entiende una homología de secuencia detectable mediante el uso de los algoritmos anteriormente citados, y preferentemente una homología de secuencia superior al 15%. Los organismos filogenéticamente más cercanos a *Picrophilus torridus*, como *Ferroplasma acidarmanus*, *Thermoplasma acidophilum*, *Thermoplasma volcanium* y *Picrophilus oshimae* son susceptibles de producir las MDP descarboxilasas más cercanas de las que tienen la SEQ ID NO 6. La homología de secuencia con respecto a la SEQ ID NO 6 de la MDP descarboxilasa de *Thermoplasma acidophilum* (número AC Q9HIN1) es, por tanto, del 38%; la de *Thermoplasma volcanium* (Q97BY2) es homóloga de la SEQ ID NO 6 en aproximadamente un 42%. El uso de estas MDP descarboxilasas se considera completamente incluido en la presente invención.

Otras enzimas del tipo mevalonato difosfato descarboxilasa, naturales o sintéticas, se pueden seleccionar dependiendo de su capacidad para producir alcanos terminales de acuerdo con la invención. De este modo, un ensayo de selección comprende la puesta en contacto de la enzima purificada, o de un microorganismo que produce la enzima, con el sustrato de la reacción, y medir la producción del compuesto alqueno terminal. Los ejemplos de este tipo de ensayos se proporcionan en la parte experimental, que incluye ensayos sobre más de 60 enzimas diferentes.

La enzima aplicada puede ser cualquier mevalonato difosfato descarboxilasa natural o producida u optimizada de forma artificial. En particular, se utiliza ventajosamente una mevalonato difosfato descarboxilasa que muestra una actividad optimizada con respecto a uno o varios 3-hidroxi-alcanoatos como se han definido anteriormente. La enzima se puede producir o seleccionar, a partir de una mevalonato difosfato descarboxilasa de referencia (natural o ya sintética u optimizada), según técnicas de ingeniería de proteínas tales como la mutagénesis aleatoria, la mutagénesis masiva, la mutagénesis dirigida, el intercambio de ADN, el intercambio sintético, la evolución *in vivo*, o la síntesis completa de genes.

A este respecto, también se describe un procedimiento de preparación de una enzima que tenga una actividad mevalonato difosfato descarboxilasa con respecto a un sustrato 3-hidroxi-alcanoato como se ha definido anteriormente, comprendiendo el procedimiento una etapa de tratamiento de una fuente de la enzima y la selección de una enzima que tenga propiedades aumentadas con respecto a dicho sustrato, por comparación con la enzima no tratada.

De esta forma, la enzima utilizada en la invención puede ser natural o sintética, y producida de forma química, biológica o genética. También puede estar químicamente modificada, por ejemplo, para mejorar su actividad, su resistencia, su especificidad, su purificación, o para inmovilizarla sobre un soporte.

La invención se caracteriza por el uso de una mevalonato difosfato descarboxilasa, en particular de una MDP descarboxilasa natural o modificada, para convertir los 3-hidroxi-alcanoatos como se han definido anteriormente en alcanos terminales.

El sustrato natural de la MDP descarboxilasa es el mevalonato difosfato, que no está incluido en la definición de los 3-hidroxi-alcanoatos.

La reacción genérica realizada mediante la MDP descarboxilasa utilizando diferentes 3-hidroxi-alcanoatos se representa en la figura 2B. Se considera que estas reacciones conducen directamente, y en una sola etapa, a los alcanos terminales.

En una primera realización, se utiliza una enzima natural o recombinante, purificada o no, para transformar un 3-hidroxi-alcanoato como se ha definido anteriormente en un alqueno terminal. Para ello, se incuba la preparación de la enzima en presencia del sustrato en condiciones físico-químicas tales que permiten que la enzima esté activa, y se deja que la incubación transcurra durante un tiempo suficiente. Al finalizar la incubación, se mide opcionalmente la presencia del alcano terminal utilizando cualquier sistema de detección conocido del experto en la materia, tal como la cromatografía en fase gaseosa o ensayos colorimétricos que permitan medir la aplicación del producto de alqueno, de fosfato libre, o que incluso permitan medir la desaparición del sustrato 3-hidroxi-alcanoato o del ATP.

En una realización preferida, se añaden cofactores para tratar lo mejor posible la reacción natural. En efecto, los 3-hidroxi-alcanoatos tienen una estructura que corresponde, de forma general, a un fragmento del MDP, y un hueco importante de la bolsa catalítica queda vacío durante la asociación enzima/sustrato. El relleno de este hueco mediante un cofactor que sustituye la parte que falta en el sustrato tiene el motivo de imitar, en lo máximo posible, la molécula de MDP. Al no modificarse mediante la reacción, el cofactor deberá añadirse a la reacción, por tanto, solo en cantidades catalíticas. En el caso donde el sustrato de la reacción sea 3-hidroxi-propionato, el cofactor complementario será el propil-difosfato. En el caso donde el sustrato de la reacción sea 3-hidroxi-butirato o 3-hidroxi-3-metil-butirato, el cofactor complementario será el etil-difosfato. En el caso donde el sustrato de la reacción sea 3-hidroxi-valerato o 3-hidroxi-3-metil-valerato, el cofactor complementario será el metil-difosfato. Estas diferentes moléculas se presentan en la figura 5. Incidentalmente, podrá suceder que el cofactor complementario de una reacción tenga un efecto positivo sobre la reacción de otro sustrato. En general, el cofactor puede ser cualquier molécula que comprenda un fosfoanhídrido, y que tenga, por tanto, la fórmula global $R-PO_2H-O-PO_3H_2$, en la que R es especialmente H, un resto alcohólico, lineal, ramificado o cíclico, o cualquier otro radical orgánico monovalente. Los motivos análogos correspondientes a los monoésteres de difosfonato de metileno, de fórmula general $R-O-PO_2H-CH_2-PO_3H_2$, en los que el fosfoanhídrido está sustituido por un puente metileno que tiene la ventaja de no hidrolizarse, también pueden constituir el cofactor. De manera más general, los cofactores pueden ser análogos de monofosfatos, es decir, sin fosfato, moléculas precursoras, o también cualquier otra molécula capaz de mejorar el rendimiento de la reacción realizando una complementación estérica o electrónica en el sitio catalítico de la enzima. En una realización particular, se añade un cosustrato a la reacción. Dicho cosustrato puede ser bien ATP, es decir, el cosustrato natural de la MDP descarboxilasa, es decir, no importa qué rNTP (ribonucleósido trifosfato) o dNTP (desoxirribonucleósido trifosfato) o no importa qué mezcla de rNTP o dNTP, o incluso de pirofosfato, u otro polifosfato.

En una realización preferida, se utiliza para transformar un 3-hidroxi-alcanoato como se ha definido anteriormente en un alqueno terminal una enzima que presenta una homología de secuencia de al menos un 15%, y preferentemente de al menos un 30%, 50%, y aún más preferentemente de al menos un 80, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% con una de las enzimas correspondientes a las secuencias SEQ ID NO:1 a 16. En concreto, la enzima puede haberse modificado genotecnológicamente a partir de una de las enzimas de la SEQ ID NO:1 a 16, o de cualquier otra mevalonato difosfato descarboxilasa identificada procedente de otras fuentes. Una enzima de ese tipo puede haber perdido su actividad MDP descarboxilasa especialmente por ingeniería genética en el laboratorio, pero también por la evolución natural (en ese caso, se puede hablar de una MDP descarboxilasa vestigial) y ha conservado o aumentado su actividad respecto una o varias moléculas de 3-hidroxi-alcanoato como se ha definido anteriormente. La generación de variantes de estas enzimas, más reactivas respecto a dichos sustratos, permite mejorar el rendimiento de la reacción de acuerdo con la invención. De este modo, la reactividad de la MDP descarboxilasa de tipo natural con respecto a los 3-hidroxi-alcanoatos como se ha definido anteriormente no es necesariamente óptima. Todos los enfoques conocidos del experto en la técnica para fabricar y seleccionar dichas variantes, tales como la mutagénesis aleatoria, la mutagénesis dirigida, la mutagénesis masiva, la mezcla de genes (intercambio de ADN) o la evolución *in vivo* se pueden utilizar. También se describe el uso de una enzima completamente artificial, obtenida mediante la concepción y realización de un gen sintético que especifica una enzima inédita, con el objetivo de convertir un 3-hidroxi-alcanoato como se ha definido anteriormente en un alqueno terminal, utilizando o no los datos conocidos de las MDP descarboxilasas para el diseño.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de una enzima que tenga una actividad descarboxilasa y que comprenda todo o parte de la secuencia SEQ ID NO: 6, o de una enzima que presenta una homología de secuencia tal como se ha descrito anteriormente, para producir un alqueno terminal. En una variante, la secuencia puede comprender, además, restos suplementarios, como por ejemplo, una etiqueta histidina en el extremo N. También se describe un procedimiento de producción de una enzima que tenga una actividad descarboxilasa y que comprenda todo o parte de la secuencia SEQ ID NO: 6, o de una enzima que presenta una homología de secuencia tal como se ha descrito anteriormente, comprendiendo el procedimiento el cultivo de un microorganismo formado por un ácido nucleico recombinante que codifica dicha secuencia en las condiciones que permite la expresión de dicha secuencia. En este contexto, se describe, además del ácido nucleico natural (SEQ ID NO: 19), un ácido nucleico que presenta una secuencia optimizada para la expresión de la enzima de la SEQ ID NO: 6 en bacterias, especialmente en *E. coli* (SEQ ID NO: 17). Este ácido nucleico, así como cualquier ácido nucleico optimizado (es decir, que permite una expresión mejorada en un 30% como mínimo con respecto a la secuencia sin modificar) se puede utilizar en la presente solicitud. La presente solicitud también describe un microorganismo que comprende un ácido nucleico recombinante que codifica una enzima que tiene una actividad descarboxilasa y que comprende todo o parte de la SEQ ID NO: 6, o de una enzima que presenta una homología de secuencia tal como se ha descrito anteriormente. El microorganismo es preferentemente una bacteria, una levadura o un hongo. La presente solicitud también describe cualquier planta o animal no humano que comprende un ácido nucleico recombinante que codifica una mevalonato difosfato descarboxilasa.

En una realización, la MDP descarboxilasa se utiliza en una forma purificada para transformar los 3-hidroxi-alcanoatos como se han definido anteriormente en alcanos terminales. Sin embargo, los costes asociados a este procedimiento son elevados, ya que los costes de producción y producción de la enzima y de los sustratos son importantes.

En otra realización, la MDP descarboxilasa está presente en la reacción en forma de un extracto no purificado, o

también en forma de bacterias no lisadas, para ahorrar los costes de purificación de la proteína. Sin embargo, los costes asociados a este procedimiento siguen siendo bastante altos debido a los costes de producción y purificación de los sustratos.

5 En otra realización de la invención, el procedimiento aplica un microorganismo vivo o una planta viva que produce la enzima que permite realizar la conversión. La invención también se caracteriza por la modificación mediante ingeniería genética de una cepa bacteriana productora de uno o varios 3-hidroxi-alcanoatos como se han definido anteriormente por ejemplo *Alcaligenes eutrophus* o *Bacillus megaterium*, o incluso una fuente de *E. coli* modificada en el laboratorio para producir dicho o dichos productos), de forma que dicha cepa bacteriana exprese en exceso la descarboxilasa, procediendo dicha enzima preferentemente de un organismo diferente al microorganismo hospedador, y que pueda generar directamente uno o varios alcanos terminales. La modificación genética puede consistir en una integración cromosómica del gen de la descarboxilasa, la expresión de la enzima mediante un plásmido que contiene un promotor antes de la secuencia que codifica la enzima, procediendo el promotor y la secuencia codificante, preferentemente, de organismos diferentes, o de cualquier otro medio conocido del experto en la técnica. Alternativamente, otras bacterias o levaduras pueden presentar ventajas concretas y conservarse. De este modo, una levadura como *Saccharomyces cerevisiae*, una bacteria extremófila como *Thermus thermophilus*, o bacterias anaerobias de la familia *Clostridia*e por ejemplo, microalgas, bacterias fotosintéticas, pueden ser de utilidad. Para producir de forma óptima el o los 3-hidroxi-alcanoato, que a continuación se convertirán en alcanos terminales, las cepas también se pueden haber modificado mediante ingeniería genética, es decir, por recombinación *in vitro* o por evolución dirigida *in vivo*.

20 De acuerdo con una realización posible, un procedimiento de la invención se caracteriza por la transformación de una fuente de carbono tal como glucosa, en 3-hidroxi-alcanoato, a continuación, la transformación de dicho producto primario en un producto secundario, es decir, en el alqueno terminal. Las diferentes etapas de dicho procedimiento se explicitan en la figura 6.

25 En una realización particular, la invención se caracteriza por la transformación de polihidroxi-alcanoatos en 3-hidroxi-alcanoato como se ha definido anteriormente, utilizando una enzima o un procedimiento físico-químico adaptado, a continuación, la transformación de dicho producto primario en un producto secundario, es decir, en el alqueno terminal. Opcionalmente, el polihidroxi-alcanoato se ha producido mediante una planta que se ha modificado en sus rutas metabólicas para producir elevados rendimientos de polihidroxi-alcanoato.

30 En una realización particular, la invención consiste en el procedimiento de producción integrada de los productos procedentes del CO₂ atmosférico o artificialmente añadido al medio de cultivo. El procedimiento de la invención se lleva a cabo en un organismo capaz de realizar la fotosíntesis, tal como, por ejemplo, las microalgas.

35 En estas realizaciones, el procedimiento de la invención sigue caracterizado por el modo de recuperación de los productos, que se desprenden del cultivo en forma gaseosa. Los alcanos terminales cortos, y especialmente el etileno, propileno, los isómeros del buteno, se encuentran efectivamente en estado gaseoso a temperatura ambiente y presión atmosférica. Por tanto, el procedimiento de la invención no requiere extracción del producto a partir del medio líquido de cultivo, etapa que siempre constituye una fuente de costes importante desde el punto de vista industrial. La evacuación y el almacenamiento de los hidrocarburos gaseosos, y su eventual separación física y conversión química posterior, se pueden hacer funcionar según cualquier procedimiento conocido del experto en la materia.

40 En una realización particular, la invención también comprende la detección del alqueno (propileno, etileno e isobutileno, especialmente) presente en la fase gaseosa del procedimiento. La presencia de los compuestos diana en un entorno de aire o de otro gas, incluso en cantidades bajas, se puede llevar a cabo mediante el uso de diferentes tecnologías y, especialmente, utilizando los sistemas de cromatografía en fase gaseosa y la detección con infrarrojos, por ionización de llama, o por hifenación con un espectrómetro de masas.

45 En una realización particular, los alcanos terminales obtenidos se condensan, posteriormente se reducen opcionalmente, utilizando técnicas conocidas por una persona experta en la materia, para producir alquenos de cadena más larga, o alquenos de cadena más larga. En particular, el isobutileno puede utilizarse para sintetizar iso-octeno: los procedimientos catalíticos para realizar correctamente esta reacción están ya bien descritos.

50 En una realización particular, el procedimiento implica el cultivo de los microorganismos en las condiciones de cultivo habituales (30 a 37°C bajo 1 atmósfera (101 kPa), en un fermentador que permita el crecimiento aerobio de bacterias) o no habituales (temperatura más alta para responder a las condiciones de cultivo de un organismo termófilo, por ejemplo).

55 En una realización particular, los microorganismos se cultivan en microaerofilia, estando limitada la cantidad de aire inyectado para minimizar la concentración de dióxígeno residual en los efluentes gaseosos cargados de hidrocarburos alquénicos.

Otros aspectos y ventajas de la invención se describirán en los ejemplos siguientes, que deben considerarse como ilustrativos y no limitativos.

Leyenda de las figuras

- Figura 1: Motivo 3-hidroxi-propionato
- Figura 2: Descarboxilación del mevalonato difosfato mediante la MDP-descarboxilasa -actividad genérica
- Figura 3: Ejemplos de 3-hidroxi-alcanoatos.
- 5 Figura 4: Utilización de la MDP descarboxilasa para generar alcanos terminales
- Figura 5: Cofactores de utilidad en la reacción para realizar la complementarización estructural dentro del sitio catalítico
- Figura 6: Procedimiento de producción integral de un alcano a partir de glucosa
- 10 Figura 7: Cromatograma realizado para reacciones enzimáticas realizadas en las condiciones n.º 1 del ejemplo 4.
Figura 8: SDS-PAGE de las etapas de expresión en exceso y purificación de la enzima con SEQ ID NO 6.
1. Marcadores
 2. Cultivo antes de la inducción
 3. Lisado
 4. Fracción no absorbida en la columna
 - 15 5. Fracción de lavado de la columna
 6. Enzima purificada, Pm = 36,8 kDa
- Figura 9: Cromatograma de un análisis de la reacción de conversión de *HIV* en *IBN* por CPG/EM. 1 y 2: Controles negativos correspondientes al ruido de fondo observado sin enzima 3 y 4: Reacciones en presencia de la enzima con la SEQ ID NO: 6.
- 20 Figura 10: Relación de producción de IBN en presencia y ausencia de ATP.
- Figura 11: Relación de producción de IBN en presencia y ausencia de Mg²⁺.
- Figura 12: Actividad enzimática en función de la temperatura. Relación: cantidad de IBN formada en presencia de la enzima con respecto al ruido de fondo.
- Figura 13: Producción de IBN en función de la concentración del sustrato HIV.
- 25 Figura 14: Medida de la reacción optimizada y comparación con el ruido de fondo. Medida por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama.
- Figura 15: Mejora del nivel de expresión por optimización de la secuencia nucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 6. Hilera M: marcadores de pesos moleculares
- Hileras 1, 2, 3: secuencia nucleotídica natural
- 30 (1) Lisato celular, fracción soluble depositada sobre la columna de purificación
 - (2) Fracción de lisato no retenida por la columna de purificación
 - (3) Fracción eluida: 10 µg de enzima purificada
- Hileras 4, 5, 6: Secuencia nucleotídica optimizada
- 35 (4) Lisato celular, fracción soluble depositada sobre la columna de purificación
 - (5) Fracción de lisato no retenida por la columna de purificación
 - (6) Fracción eluida: 10 µg de enzima purificada

Ejemplos

Ejemplo 1: clonación y expresión de varias MDP descarboxilasas.

- 40 El gen que codifica la MDP descarboxilasa de *Saccharomyces cerevisiae* se generó mediante síntesis a partir de oligonucleótidos solapantes, y posterior inserción en un plásmido pET (Novagen) que permite la expresión en bacterias. A continuación, dicho plásmido se transformó por electroporación en bacterias de la cepa BL21 (Invitrogen). Las bacterias se diseminaron sobre una placa Petri que contenía ampicilina, y se incubaron a 37°C. Al día siguiente, se seleccionó aleatoriamente una colonia bacteriana, y se utilizó para sembrar un cultivo de 50 ml de medio LB que contenía ampicilina. El cultivo se incubó durante 24 horas con agitación. Al cabo de 24 horas, el
- 45 cultivo se centrifugó, las bacterias se lisaron mediante sonicación, y se realizó un extracto proteico total. Una alícuota del extracto se depositó sobre un gel de electroforesis, junto con un extracto proteico procedente de bacterias de la misma fuente, pero sin transformar, y un marcador de pesos moleculares. En la hilera correspondiente a la cepa bacteriana transformada, se observó una banda única a aproximadamente 30 kD, correspondiente al tamaño

previsto de la proteína, sin que esta banda existiera en la hilera correspondiente a las bacterias sin transformar.

Ejemplo 2: medida de la actividad de los extractos proteicos para el 3-hidroxi-3-metil-butirato.

5 3-Hidroxi-3-metil-butirato (proporcionado por Sigma, referencia 55453 con el nombre de ácido β -hidroxiisovalérico), y suspendido a la concentración de 10 g/l. Se sintetizó el mevalonato-difosfato a partir de mevalonolactona y otros reactivos (Sigma), según la técnica convencional, y se resuspendió a la concentración de 10 g/l.

Se prepararon seis viales para cromatografía. En todos los viales, se introdujeron 50 μ l de tampón que contenía Bistris/HCl 50 mM, ditiotreitól 1 mM, MgCl₂ 10 mM, ATP 5 mM.

En los viales 1 y 4, se introdujeron 5 μ l de agua (sin ningún sustrato).

En los viales 2 y 5, se añadieron 5 μ l de la preparación de mevalonato difosfato (control positivo)

10 En los viales 3 y 6, se añadieron 5 μ l de la preparación de 3-hidroxi-3-metil-butirato (HIV)

En los viales 1, 2, y 3, se añadieron a continuación 5 μ l de agua (sin ninguna enzima)

En los viales 4, 5, y 6, se añadieron 5 μ l de la preparación enzimática descrita en el ejemplo 1.

Se precintaron los viales con un tapón provisto de septo y una pinza selladora. Todos los viales se incubaron a 37°C durante de 4 horas a 3 días.

15 Al finalizar esta incubación, se tomó una muestra del gas presente en cada vial usando una jeringa para gases, y se midió la concentración de CO₂ en estas muestras usando cromatografía en fase gaseosa. Se observa que la concentración de CO₂ es muy significativa en el vial 5, y que también se puede observar una concentración de CO₂, aunque más baja, en el vial 6, lo que refleja una reacción significativa de la preparación enzimática sobre el 3-hidroxi-3-metil-butirato.

20 A continuación se mide la presencia de isobutileno en la muestra de gas correspondiente al vial 6 usando un sistema de cromatografía de gases acoplado a un detector de infrarrojos o de ionización de llama.

Ejemplo 3: optimización de las condiciones de reacción usando un cofactor.

Se lleva a cabo la misma reacción que se ha descrito en el vial 6 del ejemplo anterior, pero usando, en una de las muestras, etil-difosfato como cofactor, sintetizado a propósito.

25 En este ejemplo, se dispone de tres viales. El primero contiene los tampones, el ATP, el extracto enzimático en las condiciones descritas en el ejemplo anterior. El segundo contiene los mismos elementos, pero además 3- hidroxi-3-metil-butirato en las condiciones descritas en el ejemplo anterior. El tercer vial contiene, además del 3-hidroxi-3-metil-butirato, 10 μ l de etil-difosfato a 10 mg/l.

30 Se mide, como en el ejemplo anterior, la formación de isobutileno utilizando un equipo de cromatografía de gases acoplado con un detector de infrarrojos o de ionización de llama. Se observa que, cuando el etil-difosfato está presente, la cantidad de isobutileno producida por unidad de tiempo es claramente superior.

Ejemplo 4. Cribado de una colección de enzimas

Una colección de sesenta y tres genes que codificaban enzimas de la familia de la MDP descarboxilasa se obtuvieron y se sometieron a ensayo para determinar su actividad sobre el sustrato HIV.

35 *Clonación, cultivos bacterianos y expresión de las proteínas.*

Los genes correspondientes a la familia difosfato mevalonato (MDP) descarboxilasas EC 4.1.1.33 se clonaron en el vector pET 25b (Novagen) para los genes de origen eucariota y pET 22b (Novagen) para los genes de origen procariota con 6 restos His añadidos al extremo N, inmediatamente después del codón metionina iniciador. Células *E. coli* BL21(DE3) competentes (Novagen) se transformaron con los vectores mediante choque térmico. Las células se cultivaron en medio TB que contenía sorbitol 0,5 M, betaína 5 mM, 100 μ g/ml de ampicilina a 30°C, con agitación (160 rpm) hasta una DO (600 nm) comprendida entre 0,8 y 1. A continuación se añadió isopropil-B-D-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final 1 mM, y se siguió la expresión de las proteínas a 20°C durante la noche (aproximadamente 16 h). Las células se recogieron mediante centrifugación a 4°C, 10.000 rpm, 20 minutos y los aglomerados se congelaron a -80°C.

45 *Lisis de las células*

1,6 g de células se descongelaron sobre hielo; las células se resuspendieron en 5 ml de Na₂HPO₄ 50 mM que contenía NaCl 300 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM pH 8. Se añadieron 20 μ l de lisonasa (Novagen), a continuación se realizó una incubación de 10 min a temperatura ambiente, y seguida de reposo durante 20 min sobre hielo. La lisis de las células bacterianas se completó por sonicación en un baño de agua caliente de ultrasonidos de 3 a 5 minutos a 0°C con homogeneización de las muestras entre los pulsos. A continuación, los extractos bacterianos se

clarificaron mediante centrifugación a 4°C, 10.000 rpm, 20 minutos.

Purificación y concentración de las proteínas (kit PROTINO)

5 Se depositaron lisados bacterianos clarificados sobre la columna PROTINO-1000 Ni-IDA (Macherey-Nagel) que permiten la absorción de las proteínas que tienen una etiqueta de 6 histidinas consecutivas (His tag). Las columnas se lavaron, y las enzimas de interés se eluyeron con 4 ml de Na₂HPO₄ 50 mM que contenía NaCl 300 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, imidazol 250 mM pH 8. Los eluatos se concentraron a continuación en células Amicon Ultra-4 10 kDa (Millipore) hasta un volumen final de 250 µl. La cantidad de enzimas se determinó por el procedimiento Bradford.

Reacciones enzimáticas

10 La actividad enzimática buscada (conversión del 3-metil 3-hidroxi butirato, o 3-hidroxi isovalerato, o también HIV) se estudió en dos condiciones experimentales diferentes para el tampón y el pH de la reacción.

Condiciones experimentales n.º 1.

15 citrato 100 mM
MgCl₂ 10 mM
ATP 10 mM
KCl 20 mM
HIV 200 mM
el pH final se ajustó a 5,5

Condiciones experimentales n.º 2.

20 Tris-HCl 100 mM pH 7,0
MgCl₂ 10 mM
ATP 10 mM
KCl 20 mM
HIV 200 mM
25 el pH final se ajustó a 7,0

A continuación se añadió la enzima a la mezcla de reacción. Como el rendimiento de producción de proteína es variable, la cantidad de enzima añadida varía de una muestra a otra entre 0,01 y 1 mg/ml. Las reacciones de control, sin enzima, se procesaron en paralelo.

30 Las reacciones (1 ml) se introdujeron en viales de 2 ml (Interchim), se precintaron con septos de teflón/silicona/teflón (Interchim). Las reacciones se incubaron a 37 °C sin agitación durante 72 horas.

Análisis de las reacciones

35 Se tomó una muestra del gas en el espacio de cabeza de la reacción con una jeringa provista de un sistema antirretorno. A continuación, el gas se analizó mediante cromatografía en fase gaseosa (CPG) hífenada con un espectrómetro de masas (EM). Previamente, el aparato se había calibrado usando una gama de concentraciones de isobutileno.

Columna: BPX5 (SGE)
CPG/EM: MSD 5973 (HP)

40 Para cada cromatograma realizado, se obtienen tres picos principales, el primero corresponde al aire, el segundo al agua, y el tercero al isobutileno. De las sesenta y tres enzimas producidas y estudiadas, se identificaron once candidatos potenciales durante la primera criba. Algunos de estos candidatos se identifican con una flecha en la Figura 7. Su identidad se presenta en la lista siguiente, y sus secuencias se presentan en las SEQ NO 6 a 16 (his-tag no incluido).

Candidato 1: SEQ ID NO: 7

45 Número de registro Genbank: CAI97800.1
Número de registro Swissprot/TrEMBL: Q1 GAB2
Microorganismos: Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (cepa ATCC 11842 / DSM 20081)

Candidato 2: SEQ ID NO: 8

50 Número de registro Genbank: CAJ51653
Número de registro Swissprot/TrEMBL: Q18K00
Microorganismos: Haloquadratum walsbyi DSM 16790

Candidato 3: SEQ ID NO: 9

Número de registro Genbank: ABD99494.1

Número de registro Swissprot/TrEMBL: Q1WU41
 Microorganismos: Lactobacillus salivarius subsp. salivarius (cepa UCC118)

Candidato 4: SEQ ID NO: 10

5 Número de registro Genbank: ABJ57000.1
 Número de registro Swissprot/TrEMBL: Q04EX2
 Microorganismos: Oenococcus oeni (cepa BAA-331 / PSU-1)

Candidato 5: SEQ ID NO: 11

10 Número de registro Genbank: ABJ67984.1
 Número de registro Swissprot/TrEMBL: Q03FN8
 Microorganismos: Pediococcus pentosaceus ATCC 25745

Candidato 6: SEQ ID NO: 12

15 Número de registro Genbank: ABV09606.1
 Número de registro Swissprot/TrEMBL: A8AUU9
 Microorganismos: Streptococcus gordonii (cepa Challis / ATCC 35105 / CH1 / DL1 / V288)

Candidato 7: SEQ ID NO: 13

Número de registro Genbank: ABQ14154.1
 Número de registro Swissprot/TrEMBL: A5EVP2
 Microorganismos: Dichelobacter nodosus VCS1703A

Candidato 8: SEQ ID NO: 14

20 Número de registro Genbank: EDT95457.1
 Número de registro Swissprot/TrEMBL: B2DRT0
 Microorganismos: Streptococcus pneumoniae CDC0288-04

Candidato 9: SEQ ID NO: 15

25 Número de registro Genbank: AAT86835
 Número de registro Swissprot/TrEMBL: Q5XCM8
 Microorganismos: Streptococcus pyogenes serotipo M6 (ATCC BAA-946 / MGAS10394)

Candidato 10: SEQ ID NO: 6

30 Número de registro Genbank: AAT43941
 Número de registro Swissprot/TrEMBL: Q6KZB1
 Microorganismos: Picophilus torridus DSM 9790

Candidato 11: SEQ ID NO: 16

Número de registro Genbank: AAV43007.1
 Número de registro Swissprot/TrEMBL: Q5FJW7
 Microorganismos: Lactobacillus acidophilus NCFM

35 La producción más elevada de IBN se observó para el candidato 10, es decir, con la enzima descarboxilasa purificada de la SEQ ID NO: 6 procedente de *Picophilus torridus*. Esta enzima se guardó para su caracterización detallada.

Ejemplo 5: Caracterización de la enzima con la SEQ ID NO: 6

40 La enzima recombinante se purificó como se describe en el ejemplo 4. Los resultados, presentados en la Figura 8, muestran que la pureza de la enzima en la muestra proteica final se estima en un 90%.

Se informó la actividad de la enzima aislada. La reacción se llevó a cabo en las condiciones siguientes:

45 Tris-HCl 100 mM pH 7,0
 MgCl₂ 10 mM
 ATP 10 mM
 KCl 20 mM
 HIV 250 mM
 el pH final se ajustó a 6,0 3 mg/ml de enzima

Tras una incubación a 30°C durante 72 h, se mide la señal por CPG/EM. Los resultados se presentan en la Figura 9. En presencia de la enzima, la producción de IBN aumentó en este punto en un factor de aproximadamente 2,3 en

comparación con el ruido de fondo. El ruido de fondo observado aquí es coherente con la bibliografía de química orgánica, que menciona que el ácido 3-hidroxi-isovalérico en solución acuosa, y a una temperatura de aproximadamente 100°C, se descarboxila lentamente para dar terc-butanol, que a su vez se convierte parcialmente por deshidratación en isobutileno, según un equilibrio favorable a la formación de terc-butanol (Pressman et Luca, J. Am. Chem. Soc. 1940).

5

Efecto del cosustrato ATP

Condiciones de ensayo citrato 100 mM
KCl 50 mM
MgCl₂ 10 mM
HIV 200 mM (a precisar)
1 mg/ml de enzima purificada
pH = 5,5
Incubación a 30°C durante 72 h

10

Condiciones	Concentración final de ATP	Enzima
1	0 mM	0 mg/ml
2	0 mM	1 mg/ml
3	10 mM	0 mg/ml
4	10 mM	1 mg/ml

Los resultados se presentan en la figura 10, y muestran que la actividad enzimática solamente se observa en presencia del cosustrato ATP. Otras moléculas, y especialmente las moléculas que contienen un enlace fosfoanhídrido, son susceptibles de constituir sustratos eficaces para la enzima.

15

Efecto del cofactor Mg²⁺

Condiciones del ensayo

citrato 100 mM pH 5,5
KCl 50 mM
ATP 10 mM
HIV 200 mM (a precisar)
pH = 5,5
1 mg/ml de enzima purificada
Incubación a 30°C durante 72 h

20

25

Condiciones	Concentración final de MgCl ₂	Enzima
1	0 mM	0 mg/ml
2	0 mM	1 mg/ml
3	5 mM	0 mg/ml
4	5 mM	1 mg/ml

Los resultados se presentan en la figura 11, y muestran que la actividad enzimática mejora en presencia de iones Mg²⁺. Otros iones, y especialmente otros iones divalentes, son susceptibles de utilizarse como cofactores en sustitución o además de los iones Mg²⁺.

Actividad enzimática en función de la temperatura

Condiciones de los ensayos

tampón 100 mM
KCl 50 mM
ATP 10 mM
HIV 200 mM (a precisar)
1 mg/ml de enzima purificada
Incubación durante 72 h a una temperatura variable.

30

35

Los resultados presentados en la figura 12 muestran que la enzima es moderadamente termoactiva y presenta un óptimo de temperatura de aproximadamente 50°C.

Actividad en función del pH

Condiciones de los ensayos

- 5 tampón 100 mM
 KCl 50 mM
 ATP 10 mM
 HIV 200 mM (a precisar)
 1 mg/ml de enzima purificada
 Incubación a 30°C durante 72 h

Las condiciones óptimas se han obtenidos a un pH de 5,5, en citrato 100 mM.

10 Parámetros enzimáticos

Se realizó una gama de sustrato realizada en las condiciones anteriormente descritas, con una incubación a 50°C. Se estima que el Km de la enzima es de HIV 40 mM.

Optimización de las condiciones de reacción

Se han investigado las condiciones de reacción óptimas. Se han considerado las condiciones siguientes:

- 15 citrato 100 mM
 KCl 50 mM
 ATP 40 mM
 HIV 200 mM
 1 mg/ml de enzima
 20 Incubación a 50°C durante 48 h

Como se muestra en la figura 14, al relación señal a ruido de fondo es de aproximadamente 100.

Ejemplo 6. Optimización del nivel de expresión de la MDP descarboxilasa de *P. torridus* en *E. coli*

- 25 El nivel de expresión inicial en *E. coli* BL21 era bajo, puesto que la banda era difícilmente visible en SDS-PAGE antes de la purificación. El índice de optimización por codón (CAI) de la secuencia natural para la expresión en *E. coli* se midió usando el programa informático "Optimizer" disponible de <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>, e inspirándose en el procedimiento de Sharp y Li (1987). El valor obtenido era solamente de 0,23, que refleja el nivel de expresión limitado de la proteína estudiada en *E. coli*.

Se generó una secuencia codificante de una proteína idéntica, pero con codones mejor adaptados a la expresión en *E. coli*. El CAI de esta secuencia, 0,77 estaba más cercano del óptimo de 1.

- 30 La secuencia natural y la secuencia optimizada se presentan en la SEQ ID NO: 17 (secuencia optimizada de la MDP descarboxilasa de *P. torridus* (AAT43941) que incluye la His Tag) y la SEQ ID NO: 19 (secuencia natural de la MDP descarboxilasa de *P. torridus* (AAT43941) que incluye la His Tag).

- 35 La secuencia optimizada se sintetizó mediante concatenación de oligonucleótidos, y se clonó en un vector de expresión pET25. Después de la transformación del vector en la cepa *E. coli* BL21(DE3) y de la inducción usando el protocolo anteriormente descrito, las proteínas se produjeron, se purificaron y se analizaron en gel de una forma similar a la descrita anteriormente. Se realizó el mismo protocolo con la secuencia natural como comparación.

La comparación entre los niveles de expresión del candidato 224 mediante el uso tanto de la secuencia nucleotídica natural como de la secuencia optimizada para la expresión en *E. coli*.

- 40 Los resultados presentados en la Figura 15 muestran que la proteína correspondiente al gen optimizado es claramente visible en el lisado celular no purificado (hilera 4), lo que se traduce en un aumento muy significativo en la expresión. La pureza de la proteína tras la etapa de purificación también es más importante en el caso del gen optimizado.

- 45 La actividad se midió sobre el lisado bruto. En efecto, ya que esta actividad era indetectable sobre el lisado en bruto obtenido con la secuencia nucleotídica natural. La expresión de la proteína se mejoró de tal manera que el lisado en bruto obtenido a partir de la secuencia nucleotídica mejorada (clon 224 optimizado) presenta actualmente esta actividad.

El medio de reacción utilizado en este ensayo fue el siguiente:

Medio de reacción

Productos	Concentración final
Tampón de reacción Tampón acetato (500 mM, pH = 5,5)	50 mM
MgCl ₂ (1M)	10 mM
KCl (1 M)	20 mM
HIV (3M)	50 mM
ATP (100 mM)	40 mM
Inhibidor de proteasas (100X)	1X
H ₂ O	
Enzima	89 ug de proteínas totales (lisado en bruto)

Incubación 2 días a 50°C.

Resultados

- 5 Condición n.º 1: Lisado del clon 224 optimizado
Condición n.º 2: Lisado del clon GB6 (plásmido pET vacío)

Condiciones	Área de la señal	Relación
1	1083	22
2	49	

Ejemplo 7: procedimiento de síntesis de isobutileno a partir de 3-hidroxi-3-metil-butirato y conversión en isoocetano.

- 10 Se llevó a cabo una reacción idéntica a la del vial 3 del ejemplo 3 en un volumen de 1 litro, introducido en un fermentador que dispone un sistema de extracción de gases. La presencia de la enzima recombinante indujo la conversión del 3-hidroxi-3-metil-butirato en iso-butileno, que se desprende naturalmente en forma de gases y se recupera mediante un sistema de extracción de gases situado en la parte superior del fermentador. El isobutileno se utilizó para generar isooceno mediante adición catalizada por la resina Amberlyst 35wet o 36wet (Rohm y Haas). Finalmente, el isooceno se recuperó por hidrogenación catalítica en isoocetano.

Ejemplo 8: ingeniería de la enzima para mejorar su eficacia para los sustratos.

- 15 Se utiliza la tecnología de mutagénesis aleatoria para generar un banco que contiene miles de mutantes a partir del gen descrito en el ejemplo 1. A continuación, este banco de mutantes se integró en el plásmido de expresión, y se transformó el banco en bacterias competentes de la cepa BL21. A continuación se aislaron un millar de bacterias, que se resiembran en tubos eppendorf que contienen 500 µl de medio LB suplementado con ampicilina. Las muestras se incubaron en un agitador durante 15 horas. Al día siguiente, se midió la cantidad de isobutileno producida usando uno u otro de los protocolos experimentales presentados en los ejemplos anteriores.

- 20 Los clones que presentaban una cantidad de isobutileno significativamente aumentada se validaron posteriormente de nuevo usando el mismo protocolo experimental. Una vez validada su mejora, el plásmido se extrajo de cada cepa mejorada, y se secuenció. Las mutaciones en el origen de la mejora de la actividad se identificaron, y se combinaron, en el mismo plásmido. El plásmido que contenía las diferentes mutaciones mejorantes se transformó a su vez en bacterias competentes, y se utilizó el mismo sistema de análisis.

- 25 El clon que combinaba las diferentes mutaciones, que presentaba una actividad significativamente superior a la del que contenía solamente una mutación mejorante, se utilizó después como bases para una nueva ronda de mutación/cribado, a la búsqueda de mutantes que mostraran una actividad todavía más mejorada.

Al finalizar este protocolo, se seleccionó el clon que contenía varias mutaciones y que tenía la mejor actividad.

- 30 **Ejemplo 9: procedimiento de síntesis del etileno a partir de 3-hidroxi-propionato.**

- 35 El gen que codifica la enzima descrita en el ejemplo 1 se insertó en un plásmido que permitía la expresión de proteínas recombinantes en una cepa de *E. coli*. El plásmido se transformó en bacterias de dicha cepa. Las bacterias transformantes se incubaron a continuación en un fermentador en presencia de propil-difosfato (10 mg/l) y de 3-hidroxi-propionato (1 g/l). La presencia de la enzima recombinante indujo la conversión del 3-hidroxi-propionato en etileno, que se desprende espontáneamente en forma de gases y se recupera mediante un sistema de extracción de gases situado en la parte superior del fermentador. A continuación se mide la presencia de etileno en la muestra de gas correspondiente usando un sistema de cromatografía de gases acoplado a un detector de infrarrojos, zona

del espectro en la que el etileno presenta una fuerte emisión.

Ejemplo 10: procedimiento de síntesis del propileno a partir de 3-hidroxi-butirano.

El gen que codifica la enzima descrita en el ejemplo 1 o una enzima descrita en el ejemplo 4 se insertó en un plásmido que permitía la expresión de proteínas recombinantes en una cepa de *E. coli*. El plásmido se transformó en bacterias de dicha cepa. Las bacterias transformantes se incubaron a continuación en un fermentador en presencia de etil-difosfato (10 mg/l) y de 3-hidroxi-butirato (1 g/l) (Sigma, referencia 166898). La presencia de la enzima recombinante indujo la conversión del 3-hidroxi-butirato en propileno, que se desprende espontáneamente en forma de gases y se recupera mediante un sistema de extracción de gases situado en la parte superior del fermentador. A continuación se mide la presencia de propileno en la muestra de gas correspondiente usando un sistema de cromatografía de gases acoplado a un detector de infrarrojos, zona del espectro en la que el propileno presenta una fuerte emisión.

Ejemplo 11: procedimiento de síntesis del propileno a partir de glucosa.

El gen que codifica la enzima descrita en el ejemplo 1 o una enzima descrita en el ejemplo 4 se insertó en un plásmido que permitía la expresión de proteínas recombinantes en la bacteria *Alcaligenes eutrophus*. El plásmido se transformó en bacterias de dicha cepa.

A continuación, las bacterias se incubaron en un fermentador en presencia de glucosa y etil-difosfato y en condiciones de microaerofilia, y se sometieron a continuación a estrés térmico, lo que tiene la consecuencia de hacerles producir grandes cantidades de 3-hidroxi-butirato. La presencia de la enzima recombinante indujo la conversión simultánea del 3-hidroxi-butirato en propileno. El propileno se desprende naturalmente en forma de gases y se recupera mediante un sistema de extracción de gases situado en la parte superior del fermentador.

Ejemplo 12: procedimiento de síntesis del propileno a partir de glucosa.

El presente ejemplo describe un procedimiento muy parecido al del ejemplo 11. La diferencia principal consiste en el uso de una cepa de *E. coli* modificada de forma que produjera 3-hidroxi-butirato y no una cepa natural tal como *Alcaligenes eutrophus*. Dicha cepa se obtuvo por ingeniería de las rutas metabólicas de forma que se consiguiera la acumulación de 3-hidroxi-butirato. La adición de una MDP descarboxilasa tal como la descrita en el ejemplo 1 o en el ejemplo 4 permite convertir el 3-hidroxi-butirato en propileno.

Ejemplo 13: procedimiento de síntesis de isobutileno a partir de glucosa.

El gen que codificaba la enzima descrita en el ejemplo 1 se insertó en un plásmido que permitía la expresión de proteínas recombinantes en una cepa de bacterias *E. coli* que, además, había experimentado alteraciones metabólicas para sintetizar 3-hidroxi-3-metil-butirato de forma endógena.

A continuación, las bacterias se incubaron en un fermentador en presencia de glucosa y en condiciones de microaerofilia. La presencia de la enzima recombinante indujo la conversión simultánea del 3-hidroxi-3-metil-butirato en isobutileno, que se desprende naturalmente en forma de gases y se recupera mediante un sistema de extracción de gases situado en la parte superior del fermentador.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Marlière, Philippe

<120> Producción de alquenos mediante descarboxilación de ácidos 3-hidroxi-alcanoicos

<130> B742PC

<160> 20

40 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 400

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45 <400> 1

ES 2 647 785 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 785 T3

				180						185					190
Pro	Glu	Leu	Arg	Val	Leu	Ile	Leu	Val	Val	Ser	Ala	Glu	Lys	Lys	Leu
		195					200					205			
Thr	Gly	Ser	Thr	Val	Gly	Met	Arg	Ala	Ser	Val	Glu	Thr	Ser	Pro	Leu
	210					215					220				
Leu	Arg	Phe	Arg	Ala	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ala	Arg	Met	Ala	Glu	Met
225					230					235					240
Ala	Arg	Cys	Ile	Arg	Glu	Arg	Asp	Phe	Pro	Ser	Phe	Ala	Gln	Leu	Thr
				245					250					255	
Met	Lys	Asp	Ser	Asn	Gln	Phe	His	Ala	Thr	Cys	Leu	Asp	Thr	Phe	Pro
			260					265					270		
Pro	Ile	Ser	Tyr	Leu	Asn	Ala	Ile	Ser	Trp	Arg	Ile	Ile	His	Leu	Val
		275					280					285			
His	Arg	Phe	Asn	Ala	His	His	Gly	Asp	Thr	Lys	Val	Ala	Tyr	Thr	Phe
	290					295					300				
Asp	Ala	Gly	Pro	Asn	Ala	Val	Ile	Phe	Thr	Leu	Asp	Asp	Thr	Val	Ala
305					310					315					320
Glu	Phe	Val	Ala	Ala	Val	Trp	His	Gly	Phe	Pro	Pro	Gly	Ser	Asn	Gly
				325					330					335	
Asp	Thr	Phe	Leu	Lys	Gly	Leu	Gln	Val	Arg	Pro	Ala	Pro	Leu	Ser	Ala
			340					345					350		
Glu	Leu	Gln	Ala	Ala	Leu	Ala	Met	Glu	Pro	Thr	Pro	Gly	Gly	Val	Lys
		355					360					365			
Tyr	Ile	Ile	Val	Thr	Gln	Val	Gly	Pro	Gly	Pro	Gln	Ile	Leu	Asp	Asp
	370					375					380				
Pro	Cys	Ala	His	Leu	Leu	Gly	Pro	Asp	Gly	Leu	Pro	Lys	Pro	Ala	Ala
					390					395					400

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

5

<400> 2

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

ES 2 647 785 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 785 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Aspergillus niger
 <400> 3

5

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

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

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

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

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

Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ala Ser Leu Arg Ala His Arg Arg Glu
 85 90 95

Leu Glu Asp Ala Asn Pro Ser Leu Pro Lys Leu Ser Ser Phe Pro Leu
 100 105 110

ES 2 647 785 T3

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

Ser Ala Ala Gly Phe Ala Ala Leu Val Arg Ala Val Ala Asp Leu Tyr
130 135 140

Gln Leu Pro Gln Ser Pro Arg Asp Leu Ser Arg Ile Ala Arg Gln Gly
145 150 155 160

Ser Gly Ser Ala Cys Arg Ser Leu Met Gly Gly Tyr Val Ala Trp Arg
165 170 175

Ala Gly Ser Leu Glu Asp Gly Ser Asp Ser Leu Ala Glu Glu Val Ala
180 185 190

Pro Gln Ser His Trp Pro Glu Met Arg Ala Leu Ile Leu Val Val Ser
195 200 205

Ala Ala Lys Lys Asp Val Pro Ser Thr Glu Gly Met Gln Thr Thr Val
210 215 220

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

Arg Met Ala Ala Ile Glu Thr Ala Ile Gln Asn Arg Asp Phe Pro Ala
245 250 255

Phe Ala Glu Ile Thr Met Arg Asp Ser Asn Ser Phe His Ala Thr Cys
260 265 270

Leu Asp Ser Trp Pro Pro Ile Phe Tyr Met Asn Asp Val Ser Arg Ala
275 280 285

Ala Val Arg Leu Val His Asp Ile Asn Arg Ala Ile Gly Arg Thr Val
290 295 300

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

Glu Lys Asp Thr Glu Leu Val Ala Gly Thr Val Lys Ala Ile Leu Gly
325 330 335

Glu Lys Thr Glu Gly Trp Glu Gly Pro Phe Tyr Thr Pro Leu Lys Asp
340 345 350

Val Thr Thr Pro Gly Val Ser Leu Asp Glu Ile Asp Pro Arg Thr Val
355 360 365

ES 2 647 785 T3

Glu Ser Leu Lys Asp Gly Val Ser Arg Val Ile Leu Thr Gly Val Gly
 370 375 380

Glu Gly Pro Ile Ser Val Asp Gln His Leu Val Ser Glu Lys Gly Asp
 385 390 395 400

Ile Leu Ser Ala

<210> 4
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus plantarum
 <400> 4

5

Met Lys Thr Val Thr Ala Lys Ala His Thr Asn Ile Ala Leu Val Lys
 1 5 10 15

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

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

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

Pro Thr Gly Lys Ser Ala Arg Ile Ser Gln Phe Leu Asp Leu Ile Arg
 65 70 75 80

Gln Arg Ser Gly Gln Thr Asn Tyr Ala Thr Val Lys Thr Glu Asn His
 85 90 95

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

Leu Ala Gly Ala Ala Ser Arg Ala Ala Gly Leu Gln Leu Asp Ala Ala
 115 120 125

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

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

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

Ile Ala Val Val Leu Lys Ala Thr Lys Lys Thr Ile Ser Ser Thr Asp

ES 2 647 785 T3

180 185 190
 Gly Met Ala Arg Val Val Ala Thr Ser Pro Tyr Tyr Pro Ala Trp Ile
 195 200 205
 Thr Thr Ala Glu Thr Asp Leu Lys Arg Met Arg Gln Ala Ile Ala Asp
 210 215 220
 Arg Asp Leu Thr Thr Val Gly Gln Ile Ala Glu Thr Asn Ala Met Arg
 225 230 235 240
 Met His Ala Leu Asn Leu Ser Ala Glu Pro Ala Phe Asn Tyr Phe Thr
 245 250 255
 Ala Asp Thr Leu Thr Ala Ile Gln Ala Val Asn Asp Leu Arg Ser His
 260 265 270
 Gly Ile Asn Cys Tyr Tyr Thr Leu Asp Ala Gly Pro Asn Val Lys Ile
 275 280 285
 Ile Cys Ala Gly Gln Asp Thr Asp Thr Ile Met Thr Gly Leu Gln Gln
 290 295 300
 His Phe Asp Ala Asp Gln Leu Ile Val Ala Lys Pro Gly Pro Gly Ile
 305 310 315 320
 Thr Ile Thr Glu Lys
 325

<210> 5
 <211> 314
 <212> PRT
 5 <213> Streptococcus pyrogenes
 <400> 5

Met Asp Pro Asn Val Ile Thr Val Thr Ser Tyr Ala Asn Ile Ala Ile
 1 5 10 15
 Ile Lys Tyr Trp Gly Lys Glu Asn Gln Ala Lys Met Ile Pro Ser Thr
 20 25 30
 Ser Ser Ile Ser Leu Thr Leu Glu Asn Met Phe Thr Thr Thr Ser Val
 35 40 45
 Ser Phe Leu Pro Asp Thr Ala Thr Ser Asp Gln Phe Tyr Ile Asn Gly
 50 55 60
 Ile Leu Gln Asn Asp Glu Glu His Thr Lys Ile Ser Ala Ile Ile Asp
 65 70 75 80

ES 2 647 785 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6
<211> 324
<212> PRT
<213> *Picrophilus torridus*
<400> 6

5

ES 2 647 785 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 785 T3

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

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

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

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

Ser Lys Asn Phe

<210> 7

<211> 319

<212> PRT

5 <213> *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 785 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Haloquadratum walsbyi
 <400> 8

5

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

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

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

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

ES 2 647 785 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ser Leu Phe

ES 2 647 785 T3

<210> 9
 <211> 322
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus salivarius subsp. salivarius

5 <400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 785 T3

210 215 220

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

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

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

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

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

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

Leu Asp

<210> 10
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> Oenococcus oeni
 <400> 10

5

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 785 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Pediococcus pentosaceus

<400> 11

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

Leu Lys Tyr Trp Gly Lys Ile Asn Ser Asp Leu Ile Leu Pro Ala Asn

5

ES 2 647 785 T3

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

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

Gly Ile Lys Phe Thr Lys Asn
 325

<210> 12
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> Streptococcus gordonii
 <400> 12

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 785 T3

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

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

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

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

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

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

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

Asp Leu Asp His Leu Ala Ala Ile Phe Glu Lys Asp Tyr Arg Leu Ile
 290 295 300

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

<210> 13
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Dichelobacter nodosus
 <400> 13

5

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 785 T3

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

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

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

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

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

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

His Thr Ala Ala Ser Ser Pro Leu Phe Ser Ser Trp Thr Gln Ala Ala
195 200 205

Glu Ala Asp Leu Lys Val Ile Tyr Gln Ala Val Leu Asp Arg Asp Phe
210 215 220

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

Ser Leu Leu Ala Ala Arg Pro Ala Ile Phe Tyr Trp Gln Pro Gln Thr
245 250 255

Leu Ala Met Leu Gln Cys Ile Trp Gln Ala Arg Ala Glu Gly Leu Ala
260 265 270

Val Tyr Ala Thr Leu Asp Ala Gly Ala Asn Val Lys Leu Leu Tyr Arg
275 280 285

Ala Gln Asp Glu Ala Glu Ile Ala Ser Met Phe Pro Gln Ala Gln Leu
290 295 300

Ile Asn Pro Phe Gln Thr Val Thr Ser Ser Ala Arg His Thr Gly Glu
305 310 315 320

Asp Ala Gln Lys Pro Ser Leu Lys
325

<210> 14
<211> 317
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae
<400> 14

ES 2 647 785 T3

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

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

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

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

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

Arg Tyr Arg Pro Ala Gly Glu Gly Phe Val Arg Ile Asp Thr Gln Asn
85 90 95

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

Ala Leu Val Lys Ala Cys Asn Ala Tyr Phe Lys Leu Gly Leu Asp Arg
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

Lys Thr Ala Ser Pro Ala Phe Ser Tyr Leu Thr Asp Ala Ser Tyr Glu

ES 2 647 785 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus acidophilus NCFM
 <400> 16

5

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

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

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

Asp Ala Lys Asn Glu Phe Tyr Leu Asn Gly Lys Arg Gln Asn Arg Gln
 50 55 60

Ala Lys Lys Arg Val Phe Ser Tyr Leu Asp Thr Leu Lys Glu Lys Phe

ES 2 647 785 T3

<210> 17

<211> 996

<212> ADN

<213> secuencia artificial

5

<220>

<223> Secuencia optimizada de la MDP descarboxilasa de *P. torridus* (AAT43941) que incluye la His Tag

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(996)

10

<400> 17

```

atg cat cat cat cat cac cac gag aac tat aat gtt aaa acc cgt gca      48
Met His His His His His His Glu Asn Tyr Asn Val Lys Thr Arg Ala
1                               5                               10          15

ttt ccg acc att ggt att att ctg ctg ggt ggc att agc gac aaa aaa      96
Phe Pro Thr Ile Gly Ile Ile Leu Leu Gly Gly Ile Ser Asp Lys Lys
                20                25                30

aac cgt att ccg ctg cat acc acc gca ggt att gca tat acc ggc atc      144
Asn Arg Ile Pro Leu His Thr Thr Ala Gly Ile Ala Tyr Thr Gly Ile
                35                40                45

aat aac gat gtg tac acc gaa acc aaa ctg tat gtg agc aaa gac gaa      192
Asn Asn Asp Val Tyr Thr Glu Thr Lys Leu Tyr Val Ser Lys Asp Glu
                50                55                60

aaa tgc tat atc gat ggc aaa gaa atc gat ctg aat agc gat cgt agc      240
Lys Cys Tyr Ile Asp Gly Lys Glu Ile Asp Leu Asn Ser Asp Arg Ser
65                70                75                80

ccg agc aaa gtg atc gat aaa ttc aaa cat gaa atc ctg atg cgt gtg      288
Pro Ser Lys Val Ile Asp Lys Phe Lys His Glu Ile Leu Met Arg Val
                85                90                95

aat ctg gat gat gaa aac aac ctg agc att gat agc cgc aat ttt aac      336
Asn Leu Asp Asp Glu Asn Asn Leu Ser Ile Asp Ser Arg Asn Phe Asn
                100                105                110

att ctg agc ggt agc agc gat agc ggt gca gca gca ctg ggt gaa tgc      384
Ile Leu Ser Gly Ser Ser Asp Ser Gly Ala Ala Ala Leu Gly Glu Cys
                115                120                125

att gaa agc atc ttc gag tac aac atc aac atc ttc acc ttt gaa aat      432
Ile Glu Ser Ile Phe Glu Tyr Asn Ile Asn Ile Phe Thr Phe Glu Asn
                130                135                140

gat ctg cag cgt att agc gaa agc gtt ggt cgt agc ctg tat ggt ggt      480
Asp Leu Gln Arg Ile Ser Glu Ser Val Gly Arg Ser Leu Tyr Gly Gly
145                150                155                160

ctg acc gtt aat tat gca aat ggt cgt gaa agc ctg acc gaa ccg ctg      528
Leu Thr Val Asn Tyr Ala Asn Gly Arg Glu Ser Leu Thr Glu Pro Leu
                165                170                175

ctg gaa ccg gaa gca ttt aac aac ttt acc atc atc ggt gcc cat ttt      576
Leu Glu Pro Glu Ala Phe Asn Asn Phe Thr Ile Ile Gly Ala His Phe
                180                185                190

aac att gat cgc aaa ccg agc aac gaa atc cac gaa aac atc atc aaa      624
Asn Ile Asp Arg Lys Pro Ser Asn Glu Ile His Glu Asn Ile Ile Lys
                195                200                205

```

ES 2 647 785 T3

```

cat gag aac tat cgc gaa cgt att aaa agc gca gag cgc aaa gca aaa      672
His Glu Asn Tyr Arg Glu Arg Ile Lys Ser Ala Glu Arg Lys Ala Lys
    210                               215                               220

aaa ctg gaa gaa ctg agc cgt aat gcc aac att aaa ggc att ttt gaa      720
Lys Leu Glu Glu Leu Ser Arg Asn Ala Asn Ile Lys Gly Ile Phe Glu
    225                               230                               235                               240

ctg gca gaa agc gat acc gtg gaa tat cat aaa atg ctg cat gat gtg      768
Leu Ala Glu Ser Asp Thr Val Glu Tyr His Lys Met Leu His Asp Val
                               245                               250                               255

ggc gtt gat att atc aat gac cgc atg gaa aat ctg att gaa cgc gtg      816
Gly Val Asp Ile Ile Asn Asp Arg Met Glu Asn Leu Ile Glu Arg Val
                               260                               265                               270

aaa gag atg aaa aac aac ttc tgg aac agc tat att gtt acc ggt ggt      864
Lys Glu Met Lys Asn Asn Phe Trp Asn Ser Tyr Ile Val Thr Gly Gly
                               275                               280                               285

ccg aat gtt ttt gtg atc acc gag aaa aaa gat gtg gat aaa gcc atg      912
Pro Asn Val Phe Val Ile Thr Glu Lys Lys Asp Val Asp Lys Ala Met
    290                               295                               300

gaa ggt ctg aat gat ctg tgt gat gat att cgt ctg ctg aaa gtt gca      960
Glu Gly Leu Asn Asp Leu Cys Asp Asp Ile Arg Leu Leu Lys Val Ala
    305                               310                               315                               320

ggt aaa ccg cag gtt atc agc aaa aac ttc taa tga                        996
Gly Lys Pro Gln Val Ile Ser Lys Asn Phe
                               325                               330

```

<210> 18
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 18

```

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

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

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

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

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

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

```

10

ES 2 647 785 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 19

<211> 993

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia natural de la MDP descarboxilasa de *P. torridus* (AAT43941) que incluye la His Tag

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(993)

<400> 19

ES 2 647 785 T3

atg cat cat cac cat cac cat gaa aat tac aat gtt aag aca agg gcg	48
Met His His His His His His Glu Asn Tyr Asn Val Lys Thr Arg Ala	
1 5 10 15	
ttc cca aca ata ggc ata ata ctg ctt ggt ggg atc tcg gat aaa aag	96
Phe Pro Thr Ile Gly Ile Ile Leu Leu Gly Gly Ile Ser Asp Lys Lys	
20 25 30	
aac agg ata ccg ctg cat aca acg gca ggc ata gca tat act ggt ata	144
Asn Arg Ile Pro Leu His Thr Thr Ala Gly Ile Ala Tyr Thr Gly Ile	
35 40 45	
aac aat gat gtt tac act gag aca aag ctt tat gta tca aaa gat gaa	192
Asn Asn Asp Val Tyr Thr Glu Thr Lys Leu Tyr Val Ser Lys Asp Glu	
50 55 60	
aaa tgc tat att gat gga aag gaa att gat tta aat tca gat aga tca	240
Lys Cys Tyr Ile Asp Gly Lys Glu Ile Asp Leu Asn Ser Asp Arg Ser	
65 70 75 80	
ccatcgc aag gtt att gat aaa ttc aag cat gaa ata ctt atg aga gta	288
Pro Ser Lys Val Ile Asp Lys Phe Lys His Glu Ile Leu Met Arg Val	
85 90 95	
aat ctt gat gat gaa aat aac ctt tca att gat tca agg aac ttt aat	336
Asn Leu Asp Asp Glu Asn Asn Leu Ser Ile Asp Ser Arg Asn Phe Asn	
100 105 110	
ata tta agt ggc agc tca gat tct ggg gcc gct gca ctg gga gag tgc	384
Ile Leu Ser Gly Ser Ser Asp Ser Gly Ala Ala Ala Leu Gly Glu Cys	
115 120 125	
ata gaa tca att ttt gaa tac aat ata aat ata ttt aca ttt gaa aac	432
Ile Glu Ser Ile Phe Glu Tyr Asn Ile Asn Ile Phe Thr Phe Glu Asn	
130 135 140	
gat ctt cag agg ata tca gaa agt gtt gga aga agc ctt tac ggt ggt	480
Asp Leu Gln Arg Ile Ser Glu Ser Val Gly Arg Ser Leu Tyr Gly Gly	
145 150 155 160	
tta aca gta aac tat gcc aat ggc agg gaa tca tta aca gag cca tta	528
Leu Thr Val Asn Tyr Ala Asn Gly Arg Glu Ser Leu Thr Glu Pro Leu	
165 170 175	
ctt gag cct gag gca ttt aat aac ttt aca ata att ggt gca cat ttt	576
Leu Glu Pro Glu Ala Phe Asn Asn Phe Thr Ile Ile Gly Ala His Phe	
180 185 190	
aac att gat aga aaa cca tca aat gag att cat gaa aat atc ata aaa	624
Asn Ile Asp Arg Lys Pro Ser Asn Glu Ile His Glu Asn Ile Ile Lys	
195 200 205	
cat gaa aat tac agg gaa aga ata aaa agt gct gag aga aag gcg aaa	672

ES 2 647 785 T3

His	Glu	Asn	Tyr	Arg	Glu	Arg	Ile	Lys	Ser	Ala	Glu	Arg	Lys	Ala	Lys		
	210					215					220						
aaa	ctt	gag	gag	cta	tca	agg	aat	gca	aac	ata	aag	ggt	atc	ttt	gaa		720
Lys	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Arg	Asn	Ala	Asn	Ile	Lys	Gly	Ile	Phe	Glu		
	225				230					235					240		
ctt	gca	gaa	tcc	gat	aca	gtg	gaa	tac	cat	aaa	atg	ctc	cat	gat	gtt		768
Leu	Ala	Glu	Ser	Asp	Thr	Val	Glu	Tyr	His	Lys	Met	Leu	His	Asp	Val		
				245					250					255			
ggc	ggt	gac	ata	ata	aat	gat	aga	atg	gag	aac	ctc	att	gaa	agg	gta		816
Gly	Val	Asp	Ile	Ile	Asn	Asp	Arg	Met	Glu	Asn	Leu	Ile	Glu	Arg	Val		
			260					265					270				
aaa	gaa	atg	aaa	aat	aac	ttc	tgg	aat	tca	tac	ata	ggt	acc	ggc	ggc		864
Lys	Glu	Met	Lys	Asn	Asn	Phe	Trp	Asn	Ser	Tyr	Ile	Val	Thr	Gly	Gly		
		275					280					285					
ccg	aac	ggt	ttt	gta	ata	aca	gag	aaa	aag	gac	ggt	gat	aag	gca	atg		912
Pro	Asn	Val	Phe	Val	Ile	Thr	Glu	Lys	Lys	Asp	Val	Asp	Lys	Ala	Met		
	290					295					300						
gaa	gga	tta	aat	gat	ctg	tgc	gat	gat	ata	aga	tta	tta	aaa	ggt	gca		960
Glu	Gly	Leu	Asn	Asp	Leu	Cys	Asp	Asp	Ile	Arg	Leu	Leu	Lys	Val	Ala		
	305				310					315					320		
gga	aag	cca	cag	gtc	att	tca	aaa	aac	ttt	taa							993
Gly	Lys	Pro	Gln	Val	Ile	Ser	Lys	Asn	Phe								
				325					330								

<210> 20
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 20

Met	His	His	His	His	His	His	Glu	Asn	Tyr	Asn	Val	Lys	Thr	Arg	Ala		
1				5					10					15			
Phe	Pro	Thr	Ile	Gly	Ile	Ile	Leu	Leu	Gly	Gly	Ile	Ser	Asp	Lys	Lys		
			20					25					30				
Asn	Arg	Ile	Pro	Leu	His	Thr	Thr	Ala	Gly	Ile	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ile		
		35					40					45					
Asn	Asn	Asp	Val	Tyr	Thr	Glu	Thr	Lys	Leu	Tyr	Val	Ser	Lys	Asp	Glu		
	50					55					60						
Lys	Cys	Tyr	Ile	Asp	Gly	Lys	Glu	Ile	Asp	Leu	Asn	Ser	Asp	Arg	Ser		
65					70					75					80		
Pro	Ser	Lys	Val	Ile	Asp	Lys	Phe	Lys	His	Glu	Ile	Leu	Met	Arg	Val		
				85					90					95			

10

ES 2 647 785 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

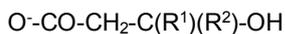
Gly Lys Pro Gln Val Ile Ser Lys Asn Phe
 325 330

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de un alqueno terminal, **caracterizado porque** comprende una etapa de conversión de un 3-hidroxi-alcanoato mediante una enzima que tiene actividad mevalonato difosfato descarboxilasa, en el que el 3-hidroxi-alcanoato es un compuesto de la fórmula



o



10 en las que R¹ y R² se seleccionan, independientemente, entre un átomo de hidrógeno, un resto metilo y un resto etilo, y en el que la conversión se realiza en presencia de un cosustrato, siendo dicho cosustrato ATP, un rNTP, un dNTP o una mezcla de varias de estas moléculas, un polifosfato, o pirofosfato.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una etapa de conversión de 3-hidroxi-butarato en propileno.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una etapa de conversión de 3-hidroxi-valerato en 1-butileno.

15 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una etapa de conversión de 3-hidroxi-3-metil-butarato en iso-butileno.

5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una etapa de conversión de 3-hidroxi-3-metil-valerato en iso-amileno.

20 6. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones anteriores, en el que la enzima comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NOS 1-16, o una secuencia que presente al menos un 15% de homología de secuencia con una de estas.

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la enzima comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50% o al menos un 80% o al menos un 90% de homología de secuencia con una de las secuencias SEQ ID NOS: 1-16

25 8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la enzima comprende todo o parte de la secuencia SEQ ID NO: 6, o de una secuencia que presente al menos un 15% de homología de secuencia con esta.

30 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la enzima comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50% o al menos un 80% o al menos un 90% de homología de secuencia con la SEQ ID NO: 6.

10. Procedimiento de producción de isobutileno, **caracterizado porque** comprende una etapa de conversión de 3-hidroxi-3-metil-butarato mediante una enzima que tiene una actividad mevalonato difosfato descarboxilasa.

35 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la enzima que tiene una actividad mevalonato difosfato descarboxilasa es una enzima que comprende todo o parte de la secuencia SEQ ID NO: 6, o de una secuencia que presente al menos un 15% de homología de secuencia con esta.

12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la enzima comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50% o al menos un 80% o al menos un 90% de homología de secuencia con la SEQ ID NO: 6.

40 13. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, según el cual se añade a la reacción un cofactor de fórmula general R-O-PO₂H-O-PO₃H₂, en la que R es un átomo de hidrógeno, un radical metilo, etilo o propilo, y puede ser también cualquier radical alcoilo, lineal, ramificado o cíclico, o cualquier otro radical orgánico monovalente.

45 14. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, según el cual se añade a la reacción un cofactor de fórmula general R-O-PO₂H-CH₂-PO₃H₂, en la que R es, preferentemente, un átomo de hidrógeno, un radical metilo, etilo o propilo, y puede ser también cualquier radical alcoilo, lineal, ramificado o cíclico, o cualquier otro radical orgánico monovalente.

15. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la etapa de conversión se realiza *in vitro*, en un sistema acelular.

50 16. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado porque** la etapa de conversión se realiza en presencia de un microorganismo que produce dicha mevalonato difosfato descarboxilasa.

17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16 **caracterizado por** el uso de un microorganismo que tiene la propiedad natural o artificial de producir uno o varios 3-hidroxi-alcanoatos como se define en la reivindicación 1 de forma endógena, y expresando o expresando en exceso, además, dicha mevalonato difosfato descarboxilasa, natural o modificada, para producir alcanos terminales directamente a partir de una fuente de carbono.
- 5 18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, donde el microorganismo es una bacteria de la cepa *Alcaligenes eutrophus* o *Bacillus megaterium*, o una bacteria, una levadura o un hongo recombinante de forma de producir en exceso uno o varios 3-hidroxi-alcanoatos como se define en la reivindicación 1.
19. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 17 o 18, donde la fuente de carbono es glucosa o cualquier otra hexosa, xilosa o cualquier otra pentosa, glicerol o cualquier otro poliol, o también almidón, celulosa, hemicelulosa, un poli-3-hidroxi-alcanoato o cualquier otro polímero, realizándose entonces el procedimiento en presencia de un sistema para degradar dicho polímero a un monómero, como por ejemplo, una enzima adaptada (amilasa, hemicelulasa, celulasa, poli-3-hidroxi-alcanoasa) y/o condiciones químicas particulares.
- 10 20. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, **caracterizado por** el uso de un microorganismo fotosintético que tiene la propiedad natural o artificial de producir uno o varios 3-hidroxi-alcanoatos de forma endógena, y expresar en exceso, además la mevalonato difosfato descarboxilasa, natural o modificada, para producir alcanos terminales directamente a partir de CO₂ presente en solución.
- 15 21. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, **caracterizado por** el uso de un primer microorganismo que permite la transformación de una fuente de carbono en 3-hidroxi-alcanoato como se define en la reivindicación 1, y de una mevalonato difosfato descarboxilasa, aislada o expresada por un segundo microorganismo, que permite la conversión de dicho 3-hidroxi-alcanoato en alqueno terminal.
- 20 22. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado por** el uso de una planta que expresa una mevalonato difosfato descarboxilasa, para producir alcanos terminales por descarboxilación de 3-hidroxi-alcanoatos como se define en la reivindicación 1.
- 25 23. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, **caracterizado por** el uso de una planta que tenga la propiedad artificial de producir de forma endógena uno o varios 3-hidroxi-alcanoatos como se define en la reivindicación 1.
24. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una etapa de recogida de gases de los alcanos terminales que se desprenden de la reacción.
- 30 25. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones anteriores **caracterizado por el hecho de** que el procedimiento se lleva a cabo en microaerofilia.
26. Uso de una enzima mevalonato difosfato descarboxilasa, o de un microorganismo que produce una mevalonato difosfato descarboxilasa, en la producción de compuestos alcanos terminales a partir de los 3-hidroxi-alcanoatos como se ha definido en la reivindicación 1.
- 35 27. Uso de una enzima mevalonato difosfato descarboxilasa de acuerdo con la reivindicación 26, **caracterizado porque** la enzima comprende todo o parte de la secuencia SEQ ID NO: 6 o de una secuencia que presente al menos un 15% de homología de secuencia con esta.
28. Uso de acuerdo con la reivindicación 27, en el que la enzima comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50% o al menos un 80% o al menos un 90% de homología de secuencia con la SEQ ID NO: 6.
- 40 29. Composición que comprende un microorganismo que produce la mevalonato difosfato descarboxilasa, un medio de cultivo adecuado, y un compuesto de 3-hidroxi-alcanoato como se ha definido en la reivindicación 1.
30. Una planta o un microorganismo que tenga la propiedad natural o artificial de producir uno o varios 3-hidroxi-alcanoatos como se ha definido en la reivindicación 1 de forma endógena, y expresando o expresando en exceso, además, una mevalonato difosfato descarboxilasa, natural o modificada, para producir alcanos terminales directamente a partir de una fuente de carbono.

Figura 1

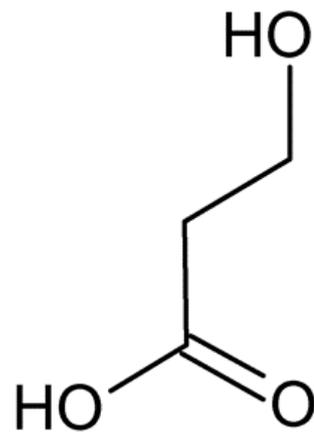


Figura 2

Mecanismo de reacción de la difosfomevalonato decarboxilasa
EC 4.1.1.33

Fig.2A Actividad fisiológica

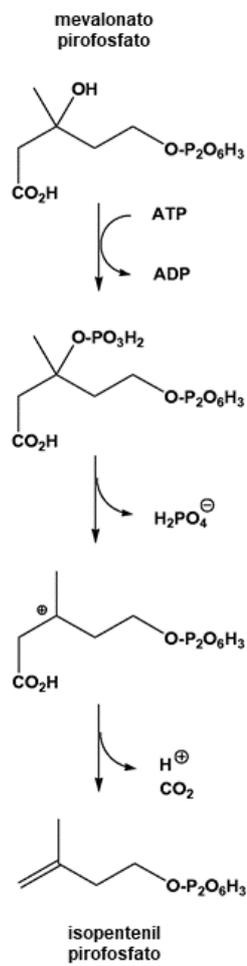


Fig.2B Actividad genérica

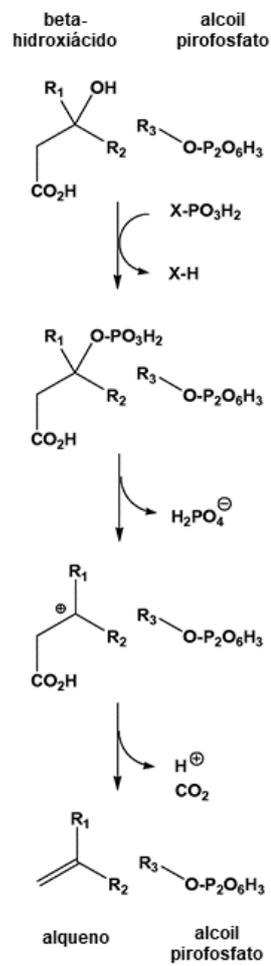
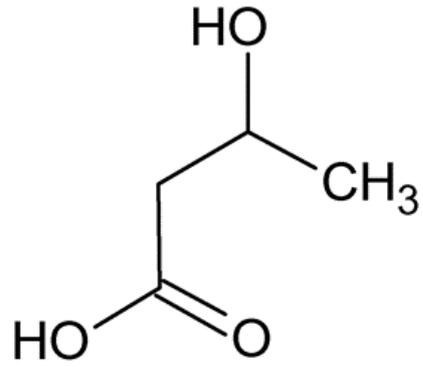
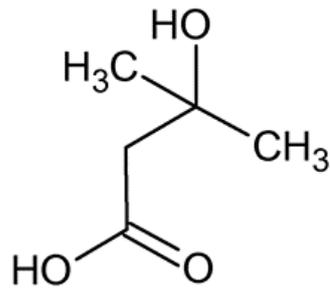


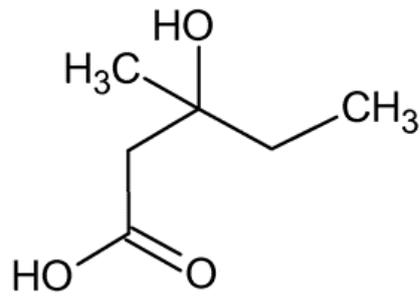
Figura 3



3-hidroxi-butirato



3-hidroxi-3-metil-butirato



3-hidroxi-3-metil-valerato

Figura 4

Fig. 4A

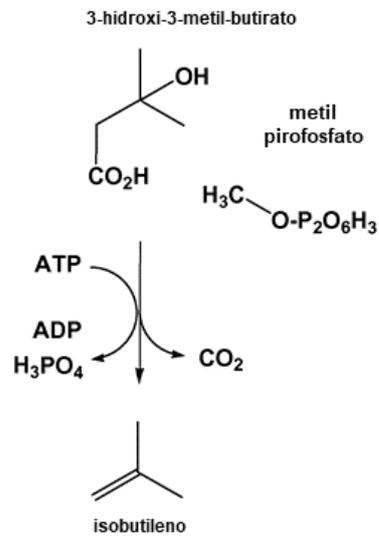


Fig. 4B

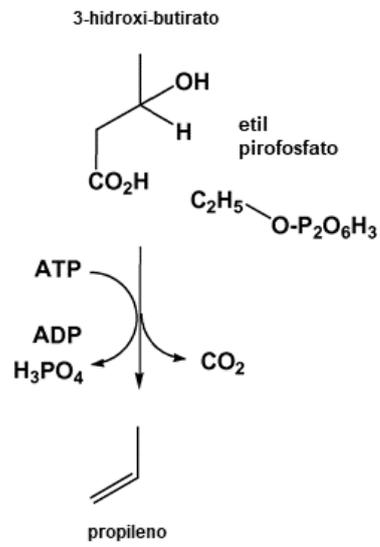


Fig. 4C

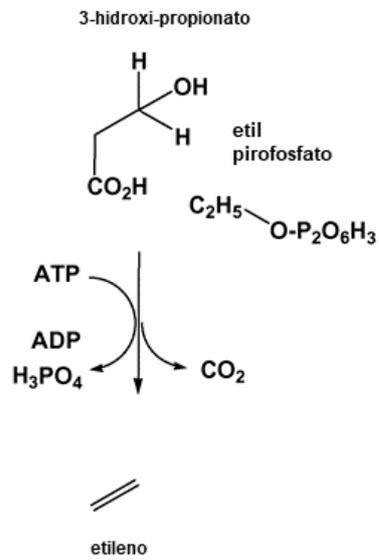


Fig. 4D

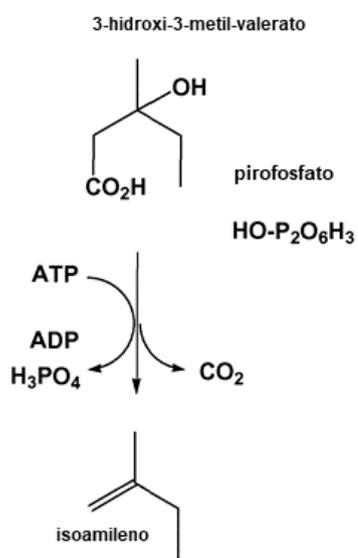
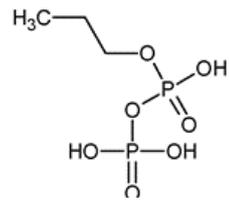
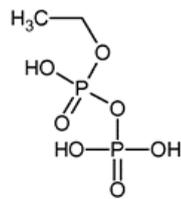


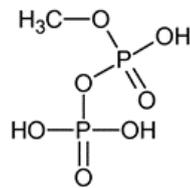
Figura 5



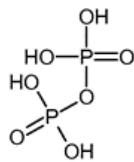
Propionil-difosfato



Etil-difosfato



Metil-difosfato



Pirofosfato

Figura 6

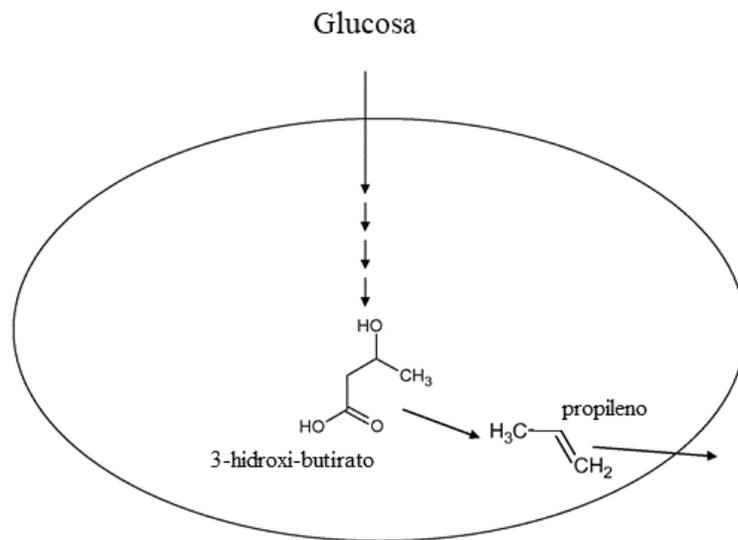


Figura 7

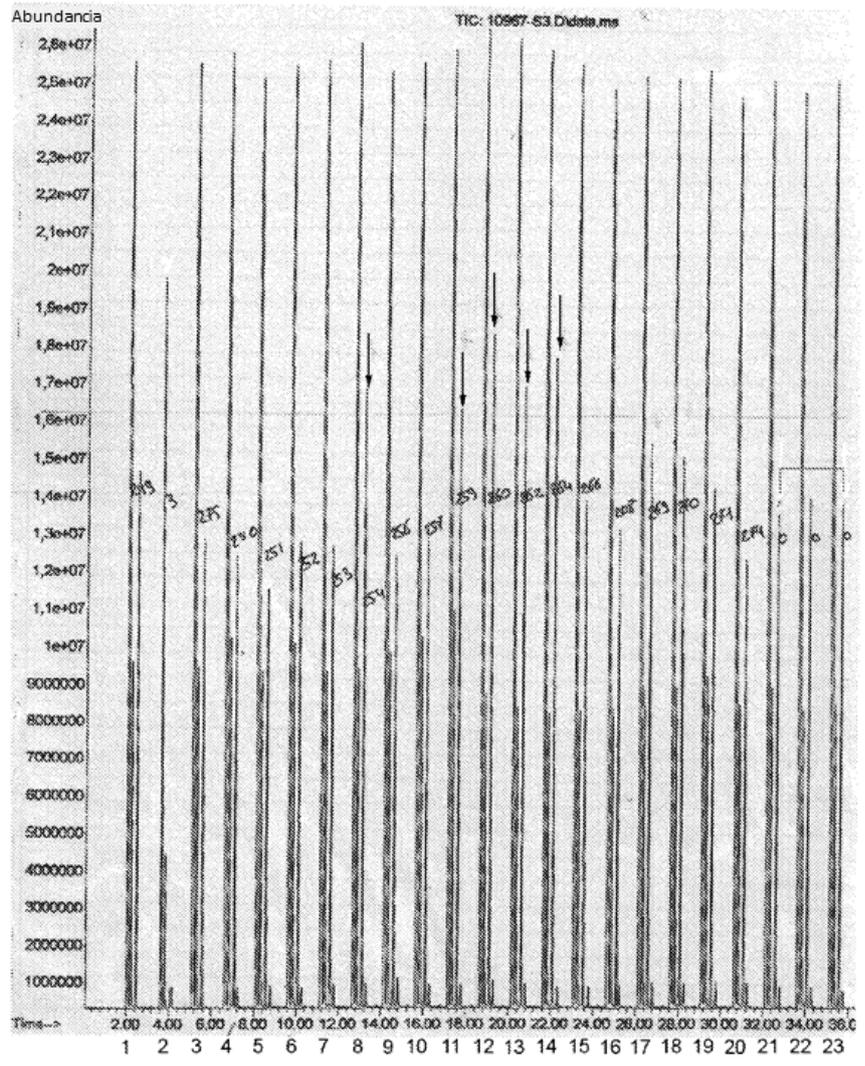


Figura 8

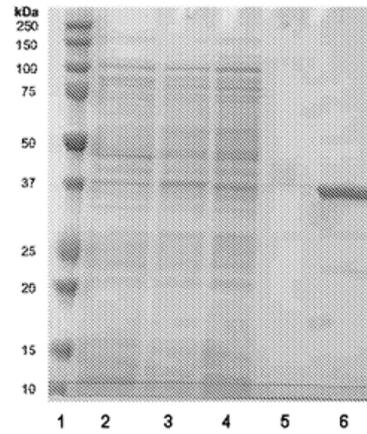


Figura 9



Figura 10

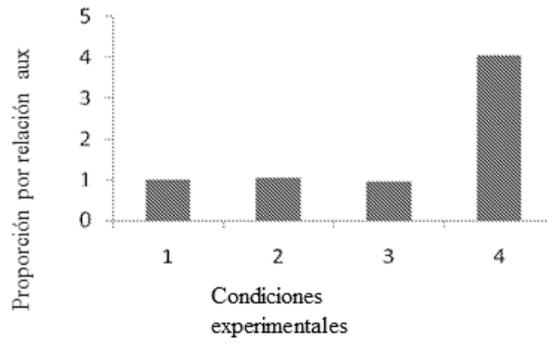


Figura 11

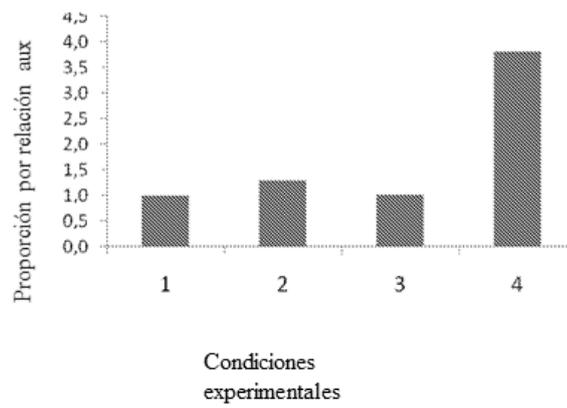


Figura 12

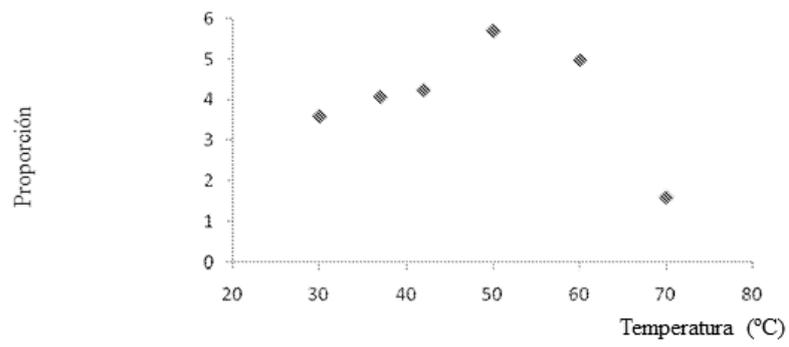


Figura 13

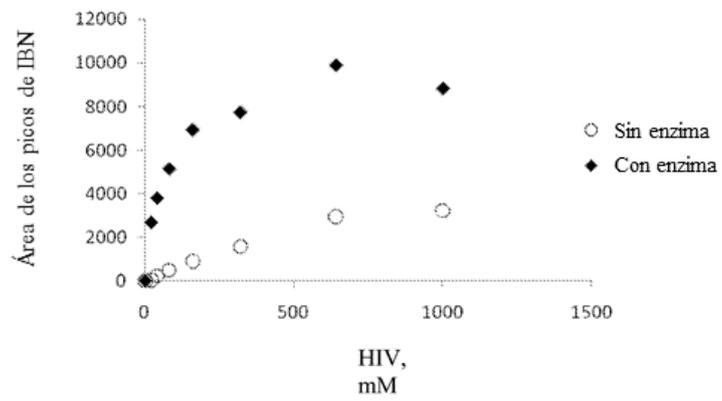


Figura 14



Figura 15

