

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 248**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88

(2006.01)

C12P 5/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2011** **PCT/EP2011/068174**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2012** **WO12052427**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2011** **E 11784957 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019** **EP 2630236**

54 Título: **Producción de alquenos mediante conversión enzimática combinada de ácidos 3-hidroxicanoicos**

30 Prioridad:

19.10.2010 EP 10188001

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

29.01.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MARLIÈRE, PHILIPPE;
DELCOURT, MARC;
ANISSIMOVA, MARIA y
TALLON, RICHARD

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 2 739 248 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 conversión enzimática combinada de ácidos 3-hidroxialcanoicos

La presente invención se refiere a un procedimiento para generar alquenos a través de un proceso biológico. Más específicamente, la invención se refiere a un procedimiento para producir alquenos (por ejemplo, propileno, etileno, 1-butileno, isobutileno o isoamileno) a partir de moléculas del tipo 3-hidroxialcanoato.

Un gran número de compuestos químicos actualmente se derivan de compuestos petroquímicos. Alquenos (tales como etileno, propileno, los diferentes butenos, o si no los pentenos, por ejemplo) se usan en la industria del plástico, por ejemplo, para producir polipropileno o polietileno, y en otras áreas de la industria química y de combustibles.

El etileno, el alqueno más simple, se encuentra en el centro de la industria orgánica industrial: es el compuesto orgánico más producido en el mundo. Se usa en particular para producir polietileno, un plástico importante. El etileno también se puede convertir en muchos productos industrialmente útiles mediante la reacción (de oxidación, de halogenación). El propileno tiene un papel igualmente importante: su polimerización da como resultado un material plástico, polipropileno. Las propiedades técnicas de este producto en términos de resistencia, densidad, solidez, deformabilidad, y transparencia son desiguales. La producción mundial de polipropileno ha crecido continuamente desde su invención en 1954.

El butileno existe en cuatro formas, una de las cuales, isobutileno, entra dentro de la composición de metil-*terc*-butil-éter (MTBE), un aditivo antidetonante para combustible de automóvil. El isobutileno también se puede usar para producir isoocteno, el cual a su vez se puede reducir a isooctano (2,2,4-trimetilpentano); el índice muy alto de octano del isooctano lo hace el mejor combustible para los denominados motores de "gasolina".

El amileno, hexeno y hepteno existen en muchas formas según la posición y la configuración del doble enlace. Estos productos tienen aplicaciones industriales reales pero son menos importantes que el etileno, propileno o butenos.

Todos estos alquenos actualmente se producen mediante el craqueo catalítico de los productos de petróleo (o mediante un derivado del proceso Fisher-Tropsch en el caso de hexeno, a partir de carbón o gas). Por tanto, su coste está de manera natural indexado al precio del petróleo. Además, el craqueo catalítico a veces está asociado con dificultades técnicas considerables que - incrementan la complejidad del procedimiento y los costes de producción.

Independientemente de las anteriores consideraciones, la bioproducción de plásticos (bioplásticos) es un campo próspero. Este auge está conducido por intereses económicos ligados al precio del petróleo, y mediante consideraciones ambientales que son tanto globales (productos neutros en carbono) como locales (manejo de los desperdicios).

La familia principal de bioplásticos es la de los polihidroxialcanoatos (PHA). Estos son polímeros obtenidos mediante la condensación de moléculas que comprenden tanto un grupo ácido como un grupo alcohol. La condensación tiene lugar mediante esterificación del ácido sobre el alcohol del siguiente monómero. Este enlace éster no es estable como el enlace carbono-carbono directo presente en los polímeros de los plásticos convencionales, lo cual explica por qué los PHA tienen una biodegradabilidad de una pocas semanas a unos pocos meses. La familia de PHA incluye en particular poli-3-hidroxibutirato (PHB), un polímero de 3-hidroxibutirato, y polihidroxibutirato-valerato (PHBV), un polímero alternativo de 3-hidroxibutirato y 3-hidroxivalerato.

PHB se produce de manera natural por algunas cepas de bacterias como *Alcaligenes eutrophus* y *Bacillus megaterium*. Se han construido bacterias de laboratorio, como *E. coli*, que han integrado rutas sintéticas que conducen a PHB o a los PHA en general. El compuesto o su polímero puede, en ciertas condiciones de laboratorio, representar hasta 80 % de la masa bacteriana (Wong MS y col., *Biotech. Bioeng.* 99 (2008), 919-928). En la década de 1980 se intentó la producción a escala industrial de PHB, pero los costes de producción del compuesto mediante fermentación se consideraron demasiado alto en el momento. Los proyectos que implican la producción directa de estos compuestos en plantas genéticamente modificadas (que han integrado las enzimas claves de la ruta sintética de PHB presente en las bacterias productoras) están en progreso y podrían implicar costes de funcionamiento inferiores.

La producción biológica de alcanos u otras moléculas de hidrocarburo que se pueden usar como combustibles o como precursores de resinas sintéticas es requerida en el contexto de una operación industrial sostenible en armonía con los ciclos geoquímicos. La primera generación de biocombustibles consistió en la producción fermentativa de etanol, ya que los procedimientos de fermentación y destilación ya existían en la industria alimentaria. La producción de biocombustibles de segunda generación está en una fase exploratoria, que abarca en particular la producción de alcoholes de larga cadena (butanol y pentanol), terpenos, alcanos lineales y ácidos grasos. Dos revisiones recientes proporcionan una visión general de la investigación en este campo: Ladygina N y col., *Process Biochemistry*, 2006, 41:1.001; y Wackett LP, *Current Opinions in Chemical Biology*, 2008, 21:187.

En la familia química de alqueno, el isopreno (2-metil-1,3-butadieno) es el motivo de terpeno que, a través de la polimerización, conduce a caucho. Se podrían desarrollar otros terpenos, mediante rutas químicas, biológicas o mixtas, como productos utilizables tales como biocombustibles o para fabricar plásticos. La referencia reciente muestra que la ruta de mevalonato (un intermediario clave en la biosíntesis de esteroide en muchos organismos) se podría usar para producir eficazmente productos de la familia del terpeno en las producciones industriales (Withers ST y col., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73:6.277).

La producción de alquenos, en particular alquenos terminales, [etileno mono- o disustituido en la posición 2: $H_2C=C(R^1)(R^2)$] aparentemente ha sido menos ampliamente investigada. La conversión de isovalerato a isobutileno

mediante la levadura *Rhodotorula minuta* ha sido descrita (Fujii T. y col., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, 54:583), pero la eficacia de esta reacción, caracterizada por un valor muy bajo del poder catalítico (k_{cat} es $1 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$), es más del que permite una aplicación industrial. El mecanismo de reacción fue elucidado por Fukuda H y col. (BBRC, 1994, 201(2):516) e implica una enzima citocromo P450 que descarboxila el isovalerato mediante reducción de un grupo de oxoferrilo $\text{Fe}^{\text{v}}=\text{O}$. En ningún momento la reacción implica hidroxilación de isovalerato. El isovalerato es también un intermediario en el catabolismo de la leucina. La biosíntesis a gran escala de isobutileno mediante esta ruta parece altamente desfavorable, puesto que requeriría la síntesis y la degradación de una molécula de leucina para formar una molécula de isobutileno. Asimismo, la enzima que cataliza la reacción usa hemo como cofactor, prestándose escasamente a expresión recombinante en bacterias y a mejora de los parámetros enzimáticos. Por todas estas razones, parece muy poco probable que esta ruta de la técnica anterior pueda servir como una base para la explotación industrial. Se ha descrito que otros microorganismos son marginalmente capaces de producir de manera natural isobutileno a partir de isovalerato; los rendimientos obtenidos son incluso inferiores a los obtenidos con *Rhodotorula minuta* (Fukuda H. y col, *Agric. Biol. Chem.*, 1984, 48:1.679).

Los mismos estudios también han descrito la producción natural de propileno: muchos microorganismos son capaces de producir propileno, una vez de nuevo con un rendimiento extremadamente bajo. La producción de etileno por plantas se ha conocido durante mucho (Meigh y col, 1960, *Nature*, 186:902). Según la ruta metabólica elucidada, la metionina es el precursor de etileno (Adams and Yang, *PNAS*, 1979, 76:170). También se ha descrito la conversión de 2-oxoglutarato (Ladygina N y col., *Process Biochemistry* 2006, 41:1.001). Puesto que la producción de una molécula de dos carbonos de etileno consume un precursor de molécula de cuatro o cinco carbonos, estas rutas parecen materialmente y energéticamente desfavorables para su aplicación industrial.

Por lo tanto, hay una necesidad de procedimientos eficaces para producir alquenos tales como etileno, propileno, 1-butileno, isobutileno, 1-amileno o isoamileno.

El documento WO2010/001078 describe un procedimiento para producir alquenos mediante conversión enzimática de ácidos 3-hidroxicanoicos con una enzima que tiene la actividad de una descarboxilasa. Tal procedimiento es ventajoso debido a que ayuda a evitar el uso de productos de petróleo, baja los costes de producción de plásticos y combustibles y puede tener un impacto ambiental global considerable permitiendo que el carbono se almacene en forma sólida. Aunque el procedimiento descrito en el documento WO 2010/001078 permite producir alquenos convirtiendo enzimáticamente 3-hidroxicanoatos, todavía existe una necesidad de mejoras, en particular, en relación a la eficacia del procedimiento para hacerlo adecuado para fines industriales. La presente solicitud aborda esta necesidad.

La presente invención describe un procedimiento para producir compuestos alqueno a partir de un 3-hidroxicanoato a través de un proceso biológico, en particular un procedimiento enzimático, en el cual dos tipos de enzimas se combinan para incrementar la eficacia de la tasa de producción. Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un alqueno, caracterizado porque comprende la conversión de un 3-hidroxicanoato en dicho alqueno por

- (i) una primera enzima que tiene una actividad de conversión del 3-hidroxicanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato; y
- (ii) una segunda enzima que es diferente de la primera enzima y que tiene una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno mediante descarboxilación y desfosforilación.

La presente invención también se refiere al uso de al menos dos enzimas, en las que una enzima se selecciona de (i) como se ha especificado anteriormente y la otra enzima se selecciona de (ii) como se ha especificado anteriormente o de un microorganismo que produce dicha combinación de enzimas, para producir un compuesto alqueno a partir de 3-hidroxicanoato.

La presente invención también se refiere a organismos, preferentemente microorganismos, los cuales producen de manera recombinante al menos dos enzimas, en las que una enzima se selecciona de (i) como se ha especificado anteriormente y la otra enzima se selecciona de (ii) como se ha especificado anteriormente.

Más específicamente, la presente invención se refiere a las realizaciones como se caracterizan en las reivindicaciones. Por lo tanto, se refiere a los siguientes artículos:

1. Un procedimiento para producir alqueno, caracterizado porque comprende la conversión de un 3-hidroxicanoato en dicho alqueno por

- (i) una primera enzima que tiene una actividad de conversión del 3-hidroxicanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato; y
- (ii) una segunda enzima que es diferente de la primera enzima y que tiene una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno mediante descarboxilación y desfosforilación.

2. El procedimiento del artículo 1 en el que

- (i) la primera enzima que tiene una actividad de conversión del 3-hidroxicanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato se selecciona del grupo que consiste en

- (A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o una

fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12;

(i) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 13 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13;

(j) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 14 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14; y

(k) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 15 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 15 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 15.

4. El procedimiento de uno cualquiera de los artículos 1 a 3, que comprende la etapa de conversión de 3-hidroxipropionato en etileno.

5. El procedimiento de uno cualquiera de los artículos 1 a 3, que comprende la etapa de conversión de 3-hidroxibutirato en propileno.

6. El procedimiento de uno cualquiera de los artículos 1 a 3, que comprende la etapa de conversión de 3-hidroxivalerato en 1-butileno.

7. El procedimiento de uno cualquiera de los artículos 1 a 3, que comprende la etapa de conversión de 3-hidroxi-3-metilbutirato en isobutileno.

8. El procedimiento de uno cualquiera de los artículos 1 a 3, que comprende la etapa de conversión de 3-hidroxi-3-metilvalerato en isoamileno.

9. El procedimiento de uno cualquiera de los anteriores artículos, caracterizado porque la etapa de conversión se lleva a cabo *in vitro*, en un sistema exento de células.

10. El procedimiento de uno cualquiera de los artículos 1 a 8 caracterizado porque el procedimiento se lleva a cabo en presencia de un microorganismo que produce de manera recombinante ambas de dichas enzimas como se definen en (i) y (ii) del artículo 1.

11. El procedimiento de uno cualquiera de los artículos 1 a 8, caracterizado por el uso de una planta, célula animal, célula vegetal o microorganismo que produce de manera recombinante ambas de dichas enzimas como se han definido en (i) y (ii) del artículo 1.

12. El procedimiento según uno cualquiera de los artículos anteriores, que comprende una etapa de recolección de alquenos gaseosos que salen de la reacción por desgasificación.

13. Una planta, célula animal, célula vegetal o un microorganismo que produce de manera recombinante al menos dos enzimas, en las que una enzima se selecciona de (i) y la otra enzima se selecciona de (ii), en las que (i) y (ii) son como sigue:

(i) una primera enzima que tiene una actividad de conversión del 3-hidroxialcanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato; y

(ii) una segunda enzima que es diferente de la primera enzima y que tiene una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno.

14. Una composición que comprende el microorganismo del artículo 13, un medio de cultivo adecuado y un compuesto 3-hidroxialcanoato o una fuente de carbono que se puede convertir por el microorganismo a un compuesto 3-hidroxialcanoato.

15. Uso de una combinación de al menos dos enzimas, en las que una enzima se selecciona del siguiente (i) y la otra enzima se selecciona del siguiente (ii) o de un microorganismo del artículo 13 o de una composición del artículo 14, para producir compuestos alqueno a partir de 3-hidroxialcanoatos, en las que (i) y (ii) son como sigue:

(i) una primera enzima que tiene una actividad de conversión del 3-hidroxialcanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato; y

(ii) una segunda enzima que es diferente de la primera enzima y que tiene una actividad de conversión de dicho

proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11;

(h) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 12 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12;

(i) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 13 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13;

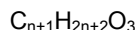
(j) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 14 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14; y

(k) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 15 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 15 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 15.

18. Un procedimiento para producir un alqueno que comprende la etapa de convertir enzimáticamente un 3-fosfonoxialcanoato en el correspondiente alqueno mediante el uso de una enzima que puede catalizar la conversión por descarboxilación y desfosforilación, en el que dicho 3-fosfonoxialcanoato se ha producido por una enzima diferente.

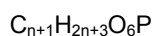
19. El procedimiento de uno cualquiera de los artículos 1 a 12 o el procedimiento del artículo 18, caracterizado porque el procedimiento se lleva a cabo con ATP, dATP, ADP, AMP, un NTP distinto a ATP, un dNTP o pirofosfato como cosustrato.

"3-hidroxi-alcanoato", como se usa en el presente documento, indica una molécula que responde a la siguiente fórmula general:



, con $1 < n < 7$, y que comprende 3-hidroxi-propionato como un motivo común (Figura 1), y opcionalmente una o dos sustituciones sobre el carbono 3. Dichos restos alquilo o grupos pueden ser lineales o ramificados. Como se usa en el presente documento, Los términos "alcoilo" y "alquilo" tienen el mismo significado y son intercambiables. Asimismo, los términos "resto" y "grupo" tienen el mismo significado y son intercambiables. Los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo son ejemplos de dichos grupos alquilo. El carbono 3 llega a ser un centro quiral si las dos sustituciones de alquilo son diferentes. La presente definición abarca las dos formas quirales, incluso si una de las dos formas, por ejemplo la forma R, es la forma principal producida de manera natural. Ejemplos de 3-hidroxi-alcanoatos se presentan en la Figura 3. Opcionalmente, se pueden añadir sustituyentes de alquilo sobre el carbono 2, los cuales luego pueden llegar a ser quirales (si los dos sustituyentes son diferentes). De igual manera, las configuraciones de los sustratos 3-hidroxi-alcanoato en la presente abarcan todos los estereoisómeros. En una realización preferida, los 3-hidroxi-alcanoatos corresponden o bien a 3-hidroxi-propionato o a variantes o derivados de 3-hidroxi-propionato en los que uno de los dos o los dos átomos de hidrógeno portados sobre el carbono 3 se sustituyen por un motivo compuesto únicamente de átomos de carbono e hidrógeno, oscilando el número de átomos de carbono de dichos sustituyentes de 1 a 5, preferentemente de 1 a 3, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo o isobutilo. El sufijo "oato", como se usa en el presente documento, puede indicar intercambiamente o bien el ion carboxilato (COO-) o ácido carboxílico (COOH). No se usa para indicar un éster. En una realización particular, los 3-hidroxi-alcanoatos se representan mediante la siguiente fórmula: HO-CO-CH₂-C(R¹)(R²)-OH u O⁻-CO-CH₂-C(R¹)(R²)-OH.

El término "3-fosfonoxialcanoato" indica una molécula que responde a la siguiente fórmula general:



, con $1 < n < 7$, y que comprende 3-fosfonoxi-propionato como un motivo común, y opcionalmente una o dos sustituciones alquilo sobre el carbono 3.

El término "alqueno", como se usa en el presente documento, indica moléculas compuestas únicamente de carbono e hidrógeno, que contienen un enlace doble carbono-carbono y que tienen la fórmula química de un hidrocarburo monoinsaturado, C_nH_{2n}, en la que n es igual a al menos dos. Preferentemente, n es igual a al menos 3, 4, 5 o 6. Lo

más preferentemente n es como mucho 6. Por lo tanto, generalmente, el término "alqueno" se refiere a una molécula que responde a la fórmula C_nH_{2n} , con $1 < n < 7$,

En una realización preferida los alquenos están representados mediante la fórmula estructural $H_2C=C(R^1)(R^2)$ en la que R^1 y R^2 se seleccionan, independientemente, del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un radical alquilo lineal o ramificado, de manera que el número total de átomos de carbono en la molécula de alqueno es como mucho 6.

Ejemplos preferidos de compuestos de alqueno según la invención son en particular etileno, propileno, isobutileno, el isoamileno (Figura 4), o si no 1-butileno y 1-amileno.

"Fuente de carbono", como se usa en el presente documento, indica cualquier compuesto de carbono que se puede usar como sustrato para los organismos según la invención. Dicho término incluye glucosa u cualquier otra hexosa, xilosa o cualquier otra pentosa, polioles tales como glicerol, sorbitol o manitol, o si no polímeros tales como almidón, celulosa o hemicelulosa, o si no poli-3-hidroxiacanoatos como poli-3-hidroxibutirato. Puede ser cualquier sustrato que permite el crecimiento de los microorganismos, tales como formato, por ejemplo. También puede ser CO_2 en el caso en el que los organismos son capaces de llevar a cabo fotosíntesis.

"Recombinante", como se usa en el presente documento, indica la modificación genética artificial de un organismo, o bien mediante adición, eliminación, o modificación de un gen cromosómico o extracromosómico o motivo regulador tal como promotor, o mediante la fusión de organismos, o mediante la adición de un vector de cualquier tipo, por ejemplo, plasmídico. El término "expresión recombinante" indica la producción de una proteína que implica una modificación genética, preferentemente para producir una proteína de origen exógeno o heterólogo con respecto a su hospedador, es decir, que no se da de manera natural en el hospedador de producción, o para producir una proteína endógena modificada o mutada.

"Sobreexpresión" o "que sobreexpresa", como se usa en el presente documento, indica la expresión recombinante de una proteína en un organismo hospedador, preferentemente que se origina de un organismo diferente de aquel en el que se expresa, incrementada en al menos 10 % y preferentemente 20 %, 50 %, 100 %, 500 % y posiblemente más en comparación con la expresión natural de dicha proteína que se da en dicho organismo hospedador. Esta definición también abarca el caso en el que no hay expresión natural de dicha proteína.

Un "cosustrato" es un compuesto o molécula añadida a la reacción enzimática, para mejorar ciertos parámetros de los mismos, y sobre todo su actividad, siendo dicho producto y el sustrato principal consumidos en cantidades iguales. Por tanto, el cosustrato se debe añadir a la reacción a una concentración comparable a la del sustrato principal. Dependiendo de la enzima, la presencia de un cosustrato puede ser requerida para la reacción enzimática.

Un "cofactor" es un producto añadido a la reacción enzimática, para mejorar ciertos parámetros de la misma, y sobre todo para mejorar su actividad, no siendo dicho producto consumido durante la reacción, y por tanto necesitando solamente ser añadido a una baja concentración, proporcional a la cantidad de enzima, por tanto, siendo dicha concentración referida como "catalítica".

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

"Homología", como se usa en el presente documento, indica la existencia de una similitud entre dos secuencias medida mediante la identidad en porcentaje entre dichas dos secuencias. En una realización preferida el término "homología" significa identidad de secuencia.

Los compuestos químicos con frecuencia se conocen por varios nombres, oficial o común. En el presente documento, se prefieren los nombres comunes de las moléculas. Por lo tanto:

- "etileno" se usa para indicar eteno
- "propileno" se usa para indicar propeno
- "butileno" se usa para indicar buteno
- "isobutileno" se usa para indicar 2-metilpropeno o isobuteno
- "amileno" se usa para indicar penteno
- "isoamileno" se usa para indicar 2-metil-but-1-eno o isopenteno
- "propionato" se usa para indicar ácido propanoico o el ion propanoato
- "butirato" se usa para indicar ácido butanoico o el ion butanoato
- "valerato" se usa para indicar ácido pentanoico o el ion pentanoato.

La presente invención describe un procedimiento para producir compuestos alqueno a partir de un 3-hidroxiacanoato a través de un proceso biológico, en particular un procedimiento enzimático, en el cual dos tipos de enzimas se combinan para incrementar la eficacia de la tasa de producción. Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un alqueno, caracterizado porque comprende la conversión de un 3-hidroxiacanoato en dicho alqueno por

- (i) una primera enzima que tiene una actividad de conversión del 3-hidroxiacanoato en el correspondiente 3-fosfoacanoato; y
- (ii) una segunda enzima que es diferente de la primera enzima y que tiene una actividad de conversión de dicho 3-fosfoacanoato en dicho alqueno -
mediante descarboxilación y desfosforilación.

Como se ha mencionado anteriormente, el documento WO 2010/001078 describe un procedimiento para producir alquenos mediante conversión enzimática de ácidos 3-hidroxiacanoicos con una enzima que tiene la actividad de una descarboxilasa. Se ha descrito en el documento WO 2010/001078 que generalmente la conversión de un 3-hidroxiacanoato en un alqueno mediante una enzima que tiene una actividad descarboxilasa, por ejemplo, una mevalonato difosfato (MDP) descarboxilasa (E.C. 4.1.1.33) tiene lugar mediante la conversión del 3-hidroxiacanoato en el correspondiente 3-fosfoacanoato el cual a continuación se somete a descarboxilación para dar el correspondiente alqueno. La reacción genérica llevada a cabo por MDP descarboxilasa que usa varios 3-hidroxiacanoatos se representa en la Figura 2B.

Actualmente se ha encontrado que diferentes descarboxilasas, en particular mevalonato difosfato descarboxilasas, catalizan las dos etapas anteriormente mencionadas con diferentes eficacias, es decir, que algunas descarboxilasas catalizan la primera etapa con una mayor eficacia que otras descarboxilasas y que algunas descarboxilasas muestran una preferencia por la segunda etapa, es decir, la etapa de descarboxilación, y que, por tanto, la eficacia de la conversión del 3-hidroxiacanoato en el alqueno como se describe en el documento WO 2010/001078 se puede incrementar significativamente combinando las correspondientes enzimas. Por lo tanto, la presente invención, en particular, se refiere a un procedimiento para alcanzar una mayor eficacia en la producción enzimática de alquenos a partir de 3-hidroxiacanoatos, es decir, un procedimiento para mejorar la eficacia de tal producción enzimática.

El término "una enzima que tiene una actividad de conversión del 3-hidroxiacanoato en el correspondiente 3-fosfoacanoato" significa una enzima que puede fosforilar un 3-hidroxiacanoato en el correspondiente 3-fosfoacanoato. El grupo fosfato viene preferentemente de una molécula ATP.

Esta actividad se puede medir, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos adjuntos, en particular el Ejemplo 5. Por lo tanto, una posibilidad es incubar la respectiva enzima con el 3-hidroxiacanoato y ATP y medir la producción de ADP (lo cual refleja la producción del correspondiente 3-fosfoacanoato). Los ensayos para medir la producción de ADP son conocidos por el experto en la técnica. Uno de estos procedimientos es el ensayo de piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa descrito en el Ejemplo 5. En este caso el ensayo mide la tasa de disminución de la absorbancia de NADH a 340 nm que es proporcional a la cantidad de ADP. En una realización preferida el término "una enzima que tiene una actividad de conversión del 3-hidroxiacanoato en el correspondiente 3-fosfoacanoato" significa una enzima que puede convertir 3-hidroxiisovalerato y ATP en 3-fosfoacanoato y ADP. Incluso más preferentemente tal enzima puede catalizar la reacción de conversión del 3-hidroxiacanoato en el correspondiente 3-fosfoacanoato, preferentemente la reacción de conversión de 3-hidroxiisovalerato y ATP en 3-fosfoxiisovalerato y ADP, con un K_M de 10 mM o inferior, por ejemplo, con un K_M de 5 mM o inferior, preferentemente de 1 mM o inferior e incluso más preferentemente de 0,1 mM o inferior. En una realización particularmente preferida dicha enzima puede catalizar la reacción de conversión del 3-hidroxiacanoato en el correspondiente 3-fosfoacanoato, preferentemente la reacción de conversión de 3-hidroxiisovalerato y ATP en 3-fosfoxiisovalerato y ADP, con un k_{cat} de al menos 0,2 s^{-1} , preferentemente con un k_{cat} de al menos 0,5 s^{-1} , particularmente preferido con un k_{cat} de al menos 1,0 s^{-1} , más preferido de al menos 2,0 s^{-1} e incluso más preferido con un k_{cat} de al menos 5,0 s^{-1} . En una realización particularmente preferida la capacidad para convertir 3-hidroxiisovalerato y ATP en 3-fosfoxiisovalerato y ADP se mide en un ensayo como se describe en el Ejemplo 5.

El término "una enzima que tiene una actividad de conversión de dicho 3-fosfoacanoato en dicho alqueno" significa una enzima que puede catalizar una reacción mediante la cual hay una descarboxilación y desfosforilación del 3-fosfoacanoato conduciendo de ese modo al correspondiente alqueno.

Esta actividad se puede medir, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos adjuntos, en particular en el Ejemplo 8. Por lo tanto, una posibilidad es incubar la respectiva enzima con el correspondiente fosfoacanoato bajo condiciones que en principio permiten la descarboxilación y la desfosforilación y detectar la producción del correspondiente alqueno, por ejemplo, mediante cromatografía de gases. En una realización preferida el término "una enzima que tiene una actividad de conversión de dicho 3-fosfoacanoato en dicho alqueno" significa una enzima que puede convertir 3-fosfoxiisovalerato en isobuteno, preferentemente bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 8. Incluso más preferentemente tal enzima puede catalizar la reacción de conversión del 3-fosfoacanoato en el correspondiente alqueno (por descarboxilación y desfosforilación) con un K_M de 100 mM o inferior, por ejemplo, con un K_M de 75 mM o inferior, o con un K_M de 50 mM o inferior, preferentemente de 10 mM o inferior o 5 mM o inferior o 1 mM o inferior, e incluso más preferentemente de 0,1 mM o inferior. En una realización particularmente preferida tal enzima puede catalizar la reacción de conversión del 3-fosfoacanoato en el correspondiente alqueno, preferentemente la reacción de conversión de 3-fosfoxiisovalerato en isobuteno, con un k_{cat} de al menos $10^{-6} s^{-1}$, preferentemente con un k_{cat} de al menos $10^{-4} s^{-1}$, por ejemplo, con un k_{cat} de al menos $10^{-3} s^{-1}$ o con un k_{cat} de al menos $10^{-2} s^{-1}$, tal como con un k_{cat} de al menos $10^{-1} s^{-1}$, por ejemplo, con un k_{cat} de al menos 0,2 s^{-1} , preferentemente con un k_{cat} de al menos 0,5 s^{-1} , particularmente preferido con un k_{cat} de al menos 1,0 s^{-1} , más preferido de al menos 2,0 s^{-1} e incluso más preferido con un k_{cat} de al menos 5,0 s^{-1} . En una realización particularmente preferida la capacidad de convertir 3-fosfoxiisovalerato en isobuteno se mide en un ensayo como se describe en el Ejemplo 8.

En una realización preferida una enzima mencionada en (i) y (ii), anterior, es una enzima que es considerada por NCBI

o un motor equivalente por tener el dominio COG3407.

En una realización preferida del procedimiento según la invención la primera enzima (i) que tiene una actividad de conversión del 3-hidroxialcanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato se selecciona del grupo que consiste en

(A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y que muestra una actividad de conversión del 3-hidroxialcanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1;

(B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y que muestra una actividad de conversión del 3-hidroxialcanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2;

(C) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 y que muestra una actividad de conversión del 3-hidroxialcanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; y

(D) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 4 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 y que muestra una actividad de conversión del 3-hidroxialcanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4.

La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de aminoácidos de una enzima de *Picrophilus torridus* DSM 9790 (número de acceso GenBank AAT43941; número de acceso Swissprot/TrEMBL Q6KZB1).

La SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de una enzima de *Thermoplasma acidophilum* (número de acceso GenBank CAC12426; número de acceso Swissprot/TrEMBL Q9HIN1).

La SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de aminoácidos de una enzima de *Thermoplasma volcanium* (número de acceso GenBank BAB59465; número de acceso Swissprot/TrEMBL Q97BY2).

La SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de aminoácidos de una enzima de *Ferroplasma acidarmanus* fer1 (número de acceso GenBank ZP_05571615).

En una realización preferida adicional del procedimiento según la invención la segunda enzima (ii) que tiene una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno se selecciona del grupo que consiste en

(a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5;

(b) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 6 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6;

(c) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 7 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7;

(d) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 8 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8;

(e) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 9 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9;

(f) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de

aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10;

(g) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 11 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11;

(h) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 12 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12;

(i) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 13 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13;

(j) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 14 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14; y

(k) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 15 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 15 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 15.

La SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de aminoácidos de una enzima clonada a partir de *Streptococcus gordonii*. La SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de aminoácidos de una enzima de *Streptococcus gordonii* str. *Challis substr.* CH1 (número de acceso GenBank AAT43941; número de acceso Swissprot/TrEMBL A8UU9). La SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de aminoácidos de una enzima de *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* ATCC BAA-102 (número de acceso GenBank EDT48420.1; número de acceso Swissprot/TrEMBL B1SCG0). La SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de aminoácidos de una enzima de *Homo sapiens* (número de acceso GenBank AAC50440.1; número de acceso Swissprot/TrEMBL P53602.1). La SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de aminoácidos de una enzima de *Lactobacillus delbrueckii* (número de acceso de GenBank CAI97800.1; número de acceso Swissprot/TrEMBL Q1GAB2). La SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de aminoácidos de una enzima de *Streptococcus mitis* (cepa B6) (número de acceso GenBank CBJ22986.1). La SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia de aminoácidos de una enzima de *Streptococcus gallolyticus* UCN34 (número de acceso GenBank CBI13757.1). La SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de aminoácidos de una enzima de *Streptococcus sanguinis* SK36 (número de acceso GenBank ABN43791.1). La SEQ ID NO: 13 muestra la secuencia de aminoácidos de una enzima de *Streptococcus* sp. M143 (número de acceso GenBank EFA24040.1). La SEQ ID NO: 14 muestra la secuencia de aminoácidos de una enzima de *Streptococcus suis* 89/1591 (número de acceso GenBank EEF63672.1). La SEQ ID NO: 15 muestra la secuencia de aminoácidos de una enzima de *Streptococcus salivarius* SK126 (número de acceso GenBank EEK09252).

En una realización preferida del procedimiento según la invención la primera enzima (i) es como se ha definido en (A) anterior y la segunda enzima (ii) es como se ha definido en (a) o (b) anteriormente mencionados, incluso más preferentemente la segunda enzima es como se ha definido en (f), (g), (h), (i), (j) o (k) anteriormente mencionados. Como se ilustra en los ejemplos, la combinación de estas enzimas es particularmente eficaz en la producción de compuestos de alqueno según la presente invención.

En otra realización preferida del procedimiento según la invención la segunda enzima (ii) que tiene una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno se selecciona de una cualquiera de las proteínas enumeradas en la siguiente Tabla o de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de tal proteína y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de dicha proteína.

Tabla 1

Organismo	Secuencia de referencia GenBank
<i>Methanosarcina mazei</i>	AAM31457.1
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	AAB98390.1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	BAE19266.1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	EA073731.1
<i>Enterococcus faecalis</i>	AAO80711.1
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	ABQ04421.1

(continuación)

Organismo	Secuencia de referencia GenBank
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	CAE79505.1
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	A9WEU8.1
<i>Legionella pneumophila</i>	CAH13175.1
<i>Listeria monocytogenes</i>	EAL09343.1
<i>Metallosphaera sedula</i>	ABP95731.1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AAO03959.1
<i>Streptococcus thermophilus</i>	AAV60266.1
<i>Bacillus coagulans</i>	EAY45229.1
<i>Chloroflexus aggregans</i>	EAV09355.1
<i>Lactobacillus brevis</i>	ABJ64001.1
<i>Lactobacillus fermentum</i>	BAG27529.1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CAD64155.1
<i>Lactobacillus salivarius</i>	ABD99494.1
<i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i>	AAK04503.1
<i>Dichelobacter nodosus</i>	ABQ14154.1
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	CAL42423.1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	EDT95457.1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	AAT86835.1
<i>Streptococcus suis</i>	ABP91444.1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	BAE05710.1
<i>Streptococcus equi</i>	ACG62435.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAC67348.1
<i>Borrelia afzelii</i>	ABH01961.1
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	CAD25409.1
<i>Streptomyces</i> sp.	BAB07791.1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	EA073731.1
<i>Streptococcus uberis</i>	CAR41735.1
<i>Gallus gallus</i>	XP_423130
<i>Salmo salmar</i>	ACI34234
<i>Natromonas pharaonis</i>	CAI48881.1
<i>Haloarcula marismortui</i>	AAV46412.1
<i>Haloquadratum walsbyi</i>	CAJ51653.1

Como se ha mencionado anteriormente, no solamente se pueden usar las proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos específicamente mencionadas enumeradas en las respectivas SEQ ID NO o en la Tabla 1, sino también proteínas que son consideradas por NCBI o un motor equivalente por tener un dominio COG3407 y, más preferido, proteínas cuya secuencia de aminoácidos muestra una homología de al menos 15 % a la secuencia de aminoácidos específicamente mencionada y que tiene una actividad enzimática respectiva al menos tan alta como la actividad de una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos específicamente mencionada. Enzimas preferidas de manera ventajosa tienen al menos x % de homología, en las que x se selecciona del grupo que consiste en 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60. En una realización preferida adicional al menos una tiene al menos 65 % de homología de secuencia, preferentemente al menos 70 %, más preferentemente al menos un 75 %, incluso más preferentemente, al menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % de homología a una de las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 o a una de las secuencias mostradas en la Tabla 1. El porcentaje de homología de secuencia se puede determinar mediante diferentes procedimientos y por medio de programas informáticos conocidos por el experto en la técnica, tales como, por ejemplo, el método de CLUSTAL o BLAST y programa informático derivado, o usando un algoritmo de comparación de secuencia tal como el descrito por Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.*, 1970, 48:443) o Smith and Waterman (*J. Mol. Biol.*, 1981, 147:195).

Tales proteínas que muestran el grado indicado de homología pueden, por ejemplo, ser otras enzimas que se dan de manera natural o que se han preparado sintéticamente. Incluyen, en particular, enzimas que se pueden seleccionar por su capacidad de producir alquenos según la invención. Por lo tanto, un ensayo de selección que comprende poner en contacto la enzima purificada, o un microorganismo que produce la enzima, con el sustrato de la reacción y medir la producción del respectivo compuesto, es decir, el 3-fosfonoxialcanoato o el alqueno. Tales ensayos se describen en la sección experimental. Tales ensayos de selección también se pueden usar para detectar enzimas con una actividad enzimática optimizada para que el sustrato se convierta en el 3-fosfonoxialcanoato o el alqueno, es decir, que tiene una actividad optimizada con respecto a uno o más de 3-hidroxialcanoatos o 3-fosfonoxialcanoatos.

Tales procedimientos de selección generalmente son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, técnicas

de ingeniería proteica tales como mutagénesis aleatoria, mutagénesis masiva, mutagénesis dirigida, redistribución de ADN, redistribución sintética, evolución *in vivo*, o síntesis completa de genes y selección posterior para la actividad enzimática deseada.

5 Por lo tanto, las enzimas usadas en la invención pueden ser naturales o sintéticas, y producidas por medios químicos, biológicos o genéticos. También se pueden modificar químicamente, por ejemplo, para mejorar su actividad, resistencia, especificidad, purificación, o para inmovilizarlas sobre un soporte.

Se ha encontrado que las enzimas que son capaces de catalizar las reacciones anteriormente descritas para convertir un 3-hidroxiacanoato en un alqueno por un 3-fosfono-hidroxiacanoato con frecuencia son enzimas que se pueden clasificar en la superfamilia filogenética de mevalonato difosfato (MDP) descarboxilasas (nomenclatura enzimática EC 10 4.1.1.33). MDP descarboxilasa es una enzima implicada en la biosíntesis del colesterol. Dicha enzima se ha aislado de una diversidad de organismos que incluyen animales, hongos, levaduras y algunas bacterias. También se puede expresar por algunas plantas (Lalitha y col., *Phytochemistry* 24 (11), (1985), 2.569-2.571). Se han clonado y secuenciado muchos genes que codifican esta enzima. Estas enzimas generalmente están compuestas de 300 a 400 aminoácidos y usan ATP como cosustrato, las cuales se convierten durante la reacción en ADP y fosfato inorgánico. 15 El grupo fosfato se transfiere de la molécula de ATP al alcohol terciario de mevalonato difosfato, liberando ADP. El intermediario de reacción fosforilado sobre el grupo 3-hidroxilo, a continuación, se somete a eliminación del grupo fosfato, en el proceso fisiológico liberando isopentenil difosfato (Figura 2).

En consecuencia, en una realización preferida, la enzima definida en (i) o (ii) anterior, es una MDP descarboxilasa. En el contexto de la presente invención una MDP descarboxilasa se define como una enzima que puede al menos catalizar 20 la conversión de 5-difosfo-3-fosfomevalonato en isopentenil-5-difosfato y CO₂ o que puede al menos catalizar la reacción de conversión de mevalonato difosfato y ATP en 5-difosfo-3-fosfomevalonato y ADP. Preferentemente, tal enzima puede catalizar ambas reacciones.

En otra realización preferida la enzima definida en (i) anterior, es una enzima como se ha definido en (i) (B). La secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2 representa una enzima identificada en *Thermoplasma acidophilum*. En 25 GenBank esta enzima se clasifica como una mevalonato difosfato descarboxilasa. Sin embargo, se sabe a partir de Chen and Poulter (*Biochemistry* 49 (2010), 207-217) que en *Th. acidophilum* existe una ruta de mevalonato alternativa que implica la acción de una mevalonato-5-monofosfato descarboxilasa. Por lo tanto, es posible que la enzima representada por la SEQ ID NO: 2 realmente represente una mevalonato-5-monofosfato descarboxilasa. Lo mismo puede ser verdad para otras bacterias arqueas. Por lo tanto, en otra realización preferida la enzima definida en (i) o 30 (ii) anterior, es una mevalonato-5-monofosfato descarboxilasa. Tal enzima es capaz de convertir mevalonato-5-monofosfato en isopentenilpirofosfato.

En realizaciones preferidas de la invención:

- 3-hidroxiisovalerato se convierte por 3-fosfonoxipropionato en etileno; o
- 3-hidroxiisobutirato se convierte por 3-fosfonoxibutirato en propileno; o
- 35 - 3-hidroxiisovalerato se convierte por 3-fosfonoxivalerato en 1-butileno; o
- 3-hidroxi-3-metilbutirato (o 3-hidroxiisovalerato) se convierte por 3-fosfonoxi-3-metilbutirato (3-fosfonoxiisovalerato) en isobutileno; o
- 3-hidroxi-3-metilvalerato se convierte por 3-fosfonoxi-3-metilvalerato en isoamileno.

El procedimiento según la invención se puede llevar a cabo *in vitro*, en presencia de enzimas aisladas (o sistemas 40 enzimáticos que comprenden además uno o más cofactores). *In vitro* preferentemente significa en un sistema exento de célula.

En una realización, las enzimas empleadas en el procedimiento se usan en forma purificada para convertir 3-hidroxiacanoatos en alquenos. Sin embargo, tal procedimiento puede ser costoso, puesto que los costes de 45 producción de enzima y sustrato y purificación son altos.

Por lo tanto, en otra realización preferida, las enzimas empleadas en el procedimiento están presentes en la reacción como un extracto no purificado, o si no en la forma de bacterias no sometidas a lisis, para economizar los costes de purificación de proteína. Sin embargo, los costes asociados con tal procedimiento aún pueden ser bastantes altos debido a los costes de producción y purificación de los sustratos.

En consecuencia, en una realización preferida, las enzimas, nativas o recombinantes, purificadas o no, se usan para 50 convertir un 3-hidroxiacanoato en un alqueno. Para hacer esto, las enzimas se incuban en presencia del sustrato en condiciones fisicoquímicas que permiten que las enzimas estén activas, y se deja que la incubación proceda durante un periodo suficiente de tiempo. Al final de la incubación, se mide opcionalmente la presencia del alqueno usando cualquier sistema de detección conocido por el experto en la técnica tal como cromatografía de gases o ensayos colorimétricos para medir la formación del producto de alqueno, o del fosfato libre, o si no para medir la desaparición 55 del sustrato 3-hidroxiacanoato o de ATP.

En una realización preferida, los cofactores se añaden para imitar mejor la reacción natural o para proporcionar complementación estérica o electrónica en la hendidura catalítica. Por ejemplo, si una de las enzimas usadas en el procedimiento según la invención es una enzima que usa de manera natural mevalonato difosfato (MDP) como sustrato, la estructura de los 3-hidroxiacanoatos deja un gran espacio en la hendidura catalítica vacía durante la unión

de enzima-sustrato puesto que generalmente un 3-hidroxi- α -alcanoato corresponde a un fragmento de MDP. Rellenar este espacio con un cofactor para reemplazar la parte perdida del sustrato tiene el fin de imitar mucho más la molécula de MDP. Ya que el cofactor no se modifica durante la reacción, por tanto, se añadirá solamente en cantidades catalíticas. En el caso en el que el sustrato de la reacción sea 3-hidroxi- α -alcanoato, el cofactor complementario será propil difosfato. En el caso en el que el sustrato sea 3-hidroxi- β -alcanoato o 3-hidroxi-3-metilbutirato, el cofactor complementario será etil difosfato. En el caso en el que el sustrato sea 3-hidroxi- γ -alcanoato o 3-hidroxi-3-metilvalerato, el cofactor complementario será metil difosfato. Estas moléculas diferentes se muestran en la Figura 5. Por casualidad, puede ocurrir que el cofactor complementario de una reacción tenga un efecto positivo sobre la reacción de otro sustrato. Generalmente, el cofactor puede ser cualquier molécula que comprende un fosfoanhidruro, y por tanto que tiene la fórmula global general $R-PO_2H-O-PO_3H_2$, en la que R es en particular H, un grupo alquilo lineal, ramificado o cíclico, que tiene preferentemente de 1 a 10 o de 1 a 5 átomos de carbono, o cualquier otro grupo orgánico monovalente. Los motivos análogos que corresponden a metileno difosfonato monoésteres, que tienen la fórmula general $R-O-PO_2H-CH_2-PO_3H_2$ en la que fosfianhidruro se reemplaza por un puente de metileno que tiene la ventaja de no ser hidrolizado, son también parte de la invención. De forma más general, los cofactores pueden ser monofosfato, o incluso exentos de fosfato, análogos de las moléculas previas, o si no cualquier otra molécula que puede mejorar el rendimiento de la reacción proporcionando complementación estérica o electrónica en el sitio catalítico enzimático. El cofactor se selecciona de manera ventajosa del grupo que consiste en ion de pirofosfato, metil difosfato, etil difosfato, o propil difosfato.

En una realización preferida, la conversión se da en presencia de un cosustrato, siendo dicho cosustrato preferentemente un compuesto que contiene un fosfoanhidruro, y siendo preferentemente ATP, un rNTP, un dNTP o una mezcla de varias de estas moléculas, un polifosfato, o pirofosfato. El cosustrato generalmente está presente en el hospedador. Sin embargo, en otra realización particular, se puede añadir un cosustrato a la reacción, seleccionado preferentemente del grupo que consiste en ATP, un rNTP, un dNTP, una mezcla de varios rNTP o dNTP, un polifosfato, y preferentemente pirofosfato, o un compuesto que contiene un fosfoanhidruro (representado por la fórmula general $X-PO_3H_2$ de la Figura 2).

Aunque la etapa de descarboxilación, es decir, la reacción definida como (ii) anterior en el presente documento, no requiere consumo de ATP, se podría mostrar que la presencia de ATP en la reacción podría ser beneficiosa. Esto se ha demostrado en el Ejemplo 7, usando 3-fosfonoxiisovalerato como sustrato. Se asume que ATP podría tener un efecto sobre el plegamiento de la proteína mediante la unión de ATP al sitio de unión a ATP de la difosfomevalonato descarboxilasa. De hecho, esto se puede observar a ojo: la enzima purificada tiene una tendencia de precipitar, y la adición de ATP previene este efecto. Se considera que no solamente ATP sino también otros compuestos similares como dATP, ADP, AMP u otros NTP o dNTP tienen este efecto. Por lo tanto, en una realización preferida, el procedimiento según la presente invención se lleva a cabo con ATP, dATP, ADP, AMP o un NTP; distinto de ATP o un dNTP como cosustrato.

En otra realización preferida el procedimiento según la invención se lleva a cabo en cultivo, en presencia de un organismo, preferentemente un microorganismo, que produce de manera recombinante las enzimas. Por lo tanto, en tal realización de la invención, se usa un organismo, preferentemente un microorganismo, que produce de manera recombinante las enzimas especificadas en (i) y (ii) anteriores. El (micro)organismo es recombinante en el sentido de que las enzimas especificadas en (i) y (ii) producidas por el hospedador son heterólogas en relación al hospedador de producción. Por lo tanto, el procedimiento se lleva a cabo directamente en el medio de cultivo, sin la necesidad de separar o purificar las enzimas. De una manera especialmente ventajosa, se usa un (micro)organismo que tiene la propiedad natural o artificial de producir endógenamente uno o más 3-hidroxi- α -alcanoatos, y también de expresar o sobreexpresar las enzimas especificadas en (i) y (ii) anteriores, naturales o modificados, para producir alquenos directamente a partir de una fuente de carbono presente en solución.

Por ejemplo, el procedimiento según la invención se puede llevar a cabo usando microorganismos que producen uno o más 3-hidroxi- α -alcanoatos [por ejemplo, *Alcaligenes eutrophus* o *Bacillus megaterium*], o si no una cepa de *E. coli* genéticamente modificada para producir dicho(s) producto(s)] y que se han modificado por ingeniería genética de modo que sobreexpresan las enzimas como se han definido en (i) y (ii) anteriores, dichas enzimas que preferentemente se originan de un organismo diferente del microorganismo hospedador. La modificación genética puede consistir, por ejemplo, en integrar los correspondientes genes que codifican las enzimas en el cromosoma, expresando las enzimas a partir de un plásmido que contiene un promotor cadena arriba de la secuencia codificante de enzima, el promotor y la secuencia codificante que se originan preferentemente de diferentes organismos, o cualquier otro procedimiento conocido por el experto en la técnica. Como alternativa, otras bacterias o levaduras pueden tener ventajas específicas y pueden ser elegidas. Por ejemplo, se pueden usar una levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae*, una bacteria extremófila tal como *Thermus thermophilus* o una bacteria anaerobia de la familia Clostridiaceae, microalgas, o bacterias fotosintéticas.

Los organismos usados en la invención pueden ser procariotas o eucariotas, preferentemente, son microorganismos tales como bacterias, levaduras, hongos o mohos, o células vegetales o células animales. En una realización particular, los microorganismos son bacterias, preferentemente del género *Escherichia*, *Alcaligenes* o *Bacillus* e incluso más preferentemente de las especies *Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus* o *Bacillus megaterium*.

En otra realización preferida, los microorganismos son bacterias recombinantes del género *Escherichia*, preferentemente de la especie *Escherichia coli*, que se ha modificado para producir endógenamente uno o más 3-hidroxi- α -alcanoatos, y que los convierte en alquenos.

En una realización preferida adicional el microorganismo es un hongo, más preferentemente un hongo del género *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus* o *Trichoderma* e incluso más preferentemente de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus niger* o de la especie *Trichoderma reesei*. En una realización particularmente preferida el microorganismo es una levadura recombinante que produce 3-hidroxiacanoatos y que los convierte en alquenos debido a la expresión de las enzimas especificadas en (i) y (ii) anteriores.

En otra realización preferida, el procedimiento según la invención hace uso de un microorganismo fotosintético que expresa las enzimas como se han especificado en (i) y (ii) anteriores. Preferentemente, el microorganismo es una bacteria fotosintética, o un microalga. Incluso más preferentemente dicho microorganismo tiene la propiedad natural o artificial de producir endógenamente uno o más 3-hidroxiacanoatos. En este caso el microorganismo debería ser capaz de producir alquenos directamente del CO₂ presente en la solución.

También es concebible el uso en el procedimiento según la invención de un microorganismo que produce una enzima como se ha definido en (i) anterior y otro microorganismo que produce una enzima como se ha definido en (ii) anterior. Además, en una realización adicional al menos uno de los microorganismos es capaz de producir uno o más 3-hidroxiacanoatos o, en una realización alternativa, se usa un microorganismo adicional en el procedimiento que es capaz de producir uno o más 3-hidroxiacanoatos.

En otra realización preferida el procedimiento según la invención hace uso de un organismo multicelular que expresa las enzimas como se han definido en (i) y (ii) anteriores. Ejemplos de tales organismos son plantas o animales.

En una realización particular, el procedimiento implica cultivar microorganismos en condiciones de cultivo estándar (30-37 °C a 101325 Pa, en un fermentador permitiendo el crecimiento aeróbico de las bacterias) o condiciones no estándar (mayor temperatura para corresponder a las condiciones de cultivo de organismos termófilos, por ejemplo).

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

En otra realización preferida el procedimiento según la invención comprende además la etapa de recolección de alquenos gaseosos que salen de la reacción por desgasificación, es decir, recuperación de los productos que se desgasifican, por ejemplo, del cultivo. Por lo tanto, en una realización preferida, el procedimiento se lleva a cabo en presencia de un sistema para recoger alqueno bajo forma gaseosa durante la reacción.

De hecho, alquenos cortos, y particularmente etileno, propileno e isómeros de buteno, adoptan el estado gaseoso a temperatura ambiente y presión atmosférica. Por tanto, el procedimiento según la invención no requiere de extracción del producto del medio de cultivo líquido, una etapa que siempre es muy costosa cuando se realiza a escala industrial. La evacuación y almacenamiento de los hidrocarburos gaseosos y su posible separación física posterior y conversión química se puede realizar según cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica.

También se desvela que el procedimiento también comprende detectar el alqueno (por ejemplo, propileno, etileno o isobutileno) que está presente en la fase gaseosa. La presencia del compuesto se puede producir en un ambiente de aire u otro gas, incluso en pequeñas cantidades, se puede detectar usando diversas técnicas y en particular usando sistemas de cromatografía de gases con detección de ionización de llama o infrarrojo, o acoplado con espectrometría de masa.

En una realización particular, se condensan los alquenos producidos mediante un procedimiento según la invención, a continuación, se reducen opcionalmente, usando técnicas conocidas por el experto en la técnica, para producir alquenos de cadena más larga, o alcanos de cadena más larga. Por ejemplo, el isobutileno se puede usar para sintetizar isooctano: los procedimientos catalíticos para llevar a cabo con éxito esta reacción ya se han descrito completamente.

En otra realización, el procedimiento según la invención se caracteriza porque la conversión de una fuente de carbono tal como glucosa, a 3-hidroxiacanoato, seguido de la conversión de dicho 3-hidroxiacanoato en el correspondiente alqueno. Las diferentes etapas de dicho procedimiento se perfilan en la Figura 6.

En una realización particular, el procedimiento se caracteriza por la conversión de polihidroxiacanoatos en 3-hidroxiacanoato usando una enzima o un procedimiento fisicoquímico adecuado, seguido de la conversión de dicho 3-hidroxiacanoato en dicho alqueno. Opcionalmente, el polihidroxiacanoato se ha producido por una microorganismo o una planta cuyas rutas metabólicas se han modificado para producir altos rendimientos de polihidroxiacanoato.

En otra realización, el procedimiento según la invención comprende la producción de alquenos de CO₂ atmosférico o de CO₂ artificialmente añadido al medio de cultivo. En este caso el procedimiento se implementa en un organismo que es capaz de llevar a cabo fotosíntesis, tal como, por ejemplo, microalga.

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir un alqueno que comprende la etapa de convertir enzimática un 3-fosfonoxiacanoato en el correspondiente alqueno mediante el uso de una enzima que puede catalizar la conversión por descarboxilación y desfosforilación, en el que dicho 3-fosfonoxiacanoato, en una primera etapa, se produce por una enzima diferente.

En relación a la enzima preferida a usar en tal procedimiento, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente

en relación con (ii) del procedimiento según la invención como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Además, también con respecto a las otras realizaciones preferidas descritas anteriormente para el procedimiento según la invención, lo mismo se aplica al procedimiento para producir un alqueno de un 3-fosfonoxialcanoato.

5 La presente invención también se refiere a organismos, preferentemente microorganismos, los cuales producen de manera recombinante al menos dos enzimas, en las que una enzima se selecciona de (i) como se ha especificado anteriormente y la otra enzima se selecciona de (ii) como se ha especificado anteriormente.

10 Tal organismo es un organismo recombinante en el sentido de que está genéticamente modificado debido a la introducción de al menos una molécula de ácido nucleico que codifica al menos una de las enzimas anteriormente mencionadas. Preferentemente tal molécula de ácido nucleico es heteróloga con respecto al organismo lo que significa que no se da de manera natural en dicho organismo.

15 Por lo tanto, la presente invención también se refiere a organismo, preferentemente un microorganismo, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima como se ha definido en (i) anterior y que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima como se ha definido en (ii) anterior. En una realización preferida al menos una de las moléculas de ácido nucleico es heteróloga al organismo lo que significa que no se da de manera natural en dicho organismo. El microorganismo es preferentemente una bacteria, una levadura o un hongo. En otra realización preferida el organismo es una planta o animal no humano. En relación a otras realizaciones preferidas, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en relación con el procedimiento según la invención.

20 Además, la presente invención también se refiere a una composición que comprende un microorganismo según la presente invención, un medio de cultivo adecuado y un compuesto 3-hidroxialcanoato o una fuente de carbono que se puede convertir por el microorganismo a un compuesto 3-hidroxialcanoato.

25 La presente invención también se refiere al uso de una combinación de al menos dos enzimas, en el que una enzima se selecciona del siguiente (i) y la otra enzima se selecciona del siguiente (ii) o de un organismo, preferentemente un microorganismo, según la invención o de una composición según la invención, para producir compuestos alqueno a partir de 3-hidroxialcanoatos, en las que (i) y (ii) son como sigue:

- (i) una primera enzima que tiene una actividad de conversión del 3-hidroxialcanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato; y
- (ii) una segunda enzima que es diferente de la primera enzima y que tiene una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno.

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

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

Leyendas de las figuras

- Figura 1: El motivo de 3-hidroxipropionato.
- Figura 2: Reacción catalizada por mevalonato difosfato descarboxilasa.
- Figura 3: Ejemplos de 3-hidroxialcanoatos.
- Figura 4: Producción de alquenos a partir de 3-hidroxialcanoatos combinando dos etapas enzimáticas.
- Figura 5: Cofactores que se pueden usar en la reacción con el fin de complementación estructural en el sitio catalítico de la mevalonato difosfato descarboxilasa.
- Figura 6: Procedimiento integrado para producir un alqueno a partir de glucosa.
- Figura 7: Selección de MDP descarboxilasas en un ensayo de complementación. La reacción catalizada por la enzima de *P. torridus* sola (0,1 mg) sin una segunda enzima, se toma como referencia.
- Figura 8: Efecto combinado de las enzimas MDP descarboxilasa de *P. torridus* y *S. gordonii* para convertir 3-hidroxiisovalerato (HIV) en isobuteno (IBN). La producción de IBN se midió en función de la concentración de MDP descarboxilasa de *S. gordonii* añadida a una mezcla de reacción preincubada de HIV con 100 µg de MDP descarboxilasa de *P. torridus*.
- Figura 9: Selección de homólogos de enzima de MDP descarboxilasa de *S. gordonii*. El área del pico de isobuteno obtenido para la reacción con enzima de *Th. acidophilum* (0,1 mg) sola (no segunda enzima), se usó como referencia (relación=1). Las MDP descarboxilasas del género *Streptococcus* son particularmente eficaces cuando se usan en combinación con una enzima del filo *P. torridus*.
- Figura 10: Esquema del ensayo de cuantificación de ADP, seguimiento del consumo de NADH por la disminución de la absorbancia a 340 nm.

Figura 11: Gráfica de la velocidad en función de la concentración de sustrato para la reacción de fosfotransferasa catalizada por MDP descarboxilasa de *P. torridus*. Las tasas iniciales se calcularon a partir de las cinéticas durante los primeros 30 minutos de la reacción.

Figura 12: Producción de isobuteno a partir de 3-hidroxiisovalerato en los siguientes ensayos:

Sin enzima

En presencia de MDP descarboxilasa de *S. mitis*

En presencia de MDP descarboxilasa de *Th. acidophilum*

En presencia de enzimas de tanto *Th. acidophilum* como *S. mitis*.

Figura 13: Esquema para la síntesis química de 3-fosfonoxiisovalerato.

Figura 14: Análisis GC de los ensayos para la producción de isobuteno a partir de 3-fosfonoxiisovalerato en ausencia y presencia de ATP. Ensayos:

1. Sin enzima, ATP 0 mM

2. 2 mg/ml de enzima, ATP 0 mM

3. Sin enzima, ATP 10 mM

4. 2 mg/ml de enzima, ATP 10 mM

Los siguientes Ejemplos sirven para ilustrar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación, expresión y purificación de una genoteca de MDP descarboxilasa.

Una genoteca de 55 genes que codifican representativos de la familia de la difosfomevalonato descarboxilasa (MDP descarboxilasa) a través de organismos eucariotas, procariotas y arqueas se construyó y se ensayó para identificar los candidatos más activos para mejorar la producción de isobuteno (IBN).

Clonación, cultivos bacterianos y expresión de proteínas.

Los genes que codifican mevalonato difosfato (MDP) descarboxilasa EC 4.1.1.33 se clonaron en el vector pET 25b (Novagen) en el caso de genes eucariotas y en pET 22b (Novagen) en el caso de genes procariotas. Un tramo de codones de 6 histidina se insertaron después del codón de iniciación de metionina para proporcionar una etiqueta de afinidad para la purificación. Las células de *E. coli* BL21(DE3) competentes (Novagen) se transformaron con estos vectores según el procedimiento de choque térmico. Las células transformadas se cultivaron con agitación (160 rpm) sobre medio de autoinducción ZYM-5052 (Studier FW, *Prot.Exp.Pur.* 41, (2005), 207-234) durante 6 h a 37 °C y la expresión proteica se continuó a 28 °C durante la noche (aproximadamente 16 h). Las células se recogieron por centrifugación a 4 °C, 10.000 rpm durante 20 min y los sedimentos se congelaron a -80 °C.

Purificación y concentración de proteína.

Los sedimentos de 200 ml de las células de cultivo se descongelaron sobre hielo y se resuspendieron en 5 ml de Na₂HPO₄ pH 8 que contenía NaCl 300 mM, MgCl₂ 5 mM y DTT 1 mM. Se añadieron veinte microlitros de lisonasa (Novagen). Las células se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se volvieron a hielo durante 20 minutos. La lisis celular se completó mediante sonicación durante 3 x 15 segundos. A continuación, los extractos bacterianos se clarificaron mediante centrifugación a 4 °C, 10.000 rpm durante 20 min. Los lisados bacterianos clarificados se cargaron en columna PROTINO-1000 Ni-TED (Macherey-Nagel) permitiendo la adsorción de proteínas 6-His etiquetadas. Las columnas se lavaron y las enzimas de interés se eluyeron con 4 ml de Na₂HPO₄ 50 mM pH 8 que contenía NaCl 300 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, Imidazol 250 mM. A continuación, los eluidos se concentraron y se desalaron sobre la unidad de filtro de 10 kDa Amicon Ultra-4 (Millipore) y se resuspendieron en 0,25 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,4 que contenía DTT 0,5 mM y MgCl₂ 5 mM. Las concentraciones de proteína se cuantificaron según el procedimiento Bradford. Por lo tanto, la pureza de las proteínas purificadas variaron de 40 % a 90 %.

Ejemplo 2: Selección de la genoteca de MDP descarboxilasa.

Las MDP descarboxilasas se evaluaron usando un ensayo de complementación. La MDP descarboxilasa de *P. torridus* se incubó junto con cada enzima ensayada de la genoteca.

El ensayo enzimático se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

Tris HCl 50 mM pH 7,0

MgCl₂ 10 mM

KCl 20 mM

ATP 40 mM

3-hidroxiisovalerato (HIV) 50 mM

El pH se ajustó a 7,0

100 µg de la MDP descarboxilasa de *P. torridus* y 1 mg de la MDP descarboxilasa a ensayar se añadieron a 1 ml de

la mezcla de reacción. Se usó una mezcla de reacción que contenía solamente 100 µg de MDP descarboxilasa de *P. torridus* como referencia. A continuación, la mezcla se incubó sin agitación a 45 °C durante 90 h en un vial sellado (Interchim).

5 Un ml de la fase gaseosa se recogió y se inyectó en un cromatógrafo de gases HP5890 (HP) equipado con un detector FID y una columna CP SilicaPlot (Varian). Se usó isobuteno comercial como referencia.

Este procedimiento de selección condujo a la identificación de varias enzimas MDP descarboxilasa incrementando la tasa de producción de isobuteno. Como se muestra en la Figura 7, se observó una producción mayor de isobuteno para las siguientes MDP descarboxilasas.

Candidato 1:

10 Número de acceso GenBank: CAI97800
Número de acceso SwissProt/TrEMBL: Q1GAB2
Organismo: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ATCC 11842

Candidato 2:

15 Número de acceso GenBank: AAC50440.1
Número de acceso SwissProt/TrEMBL: P53602.1
Organismo: *Homo sapiens*

Candidato 3:

20 Número de acceso GenBank: ABV09606
Número de acceso SwissProt/TrEMBL: A8AUU9
Organismo: *Streptococcus gordonii str. Challis substr. CH1*

La mayor producción de isobuteno se observó con MDP descarboxilasa purificada de *Streptococcus gordonii*. Esto indicó que las dos enzimas presentes en el ensayo (una de *P. torridus* y la otra de *S. gordonii*) estaban realizando complementariamente las dos etapas de reacción que producen IBN a partir de HIV: transferencia del grupo fosforilo terminal del ATP al oxígeno en C3 de 3-hidroxiisovalerato seguido de desfosforilación-descarboxilación combinada del 3-fosfonoxiisovalerato intermediario.

Ejemplo 3: Efecto de la concentración de enzima sobre el rendimiento de la producción de isobuteno.

El efecto de la concentración de la MDP descarboxilasa de *Streptococcus gordonii* se valoró bajo las siguientes condiciones:

30 Tris-HCl 50 mM pH 7,0
MgCl₂ 10 mM
KCl 20 mM
ATP 40 mM
3-hidroxiisovalerato (HIV) 50 mM

El pH se ajustó a 7,0

35 100 µg de MDP descarboxilasa de *P. torridus* y una cantidad variante (de 0 a 1 mg) de la MDP descarboxilasa purificada de *Streptococcus gordonii* se añadieron a 1 ml de la mezcla de reacción. A continuación, la mezcla se incubó sin agitación a 45 °C durante 90 h en un vial sellado (Interchim).

Un ml de la fase espacio de cabeza se recogió y se inyectó en un cromatógrafo de gases HP5890 (HP) equipado con un detector FID y una columna CP SilicaPlot (Varian). Se usó isobuteno comercial como referencia.

40 Incrementar la concentración de la enzima de *S. gordonii* dio como resultado un incremento de la cantidad del isobuteno producido (Figura 8).

Ejemplo 4: Selección de una genoteca de homólogos de MDP descarboxilasa de *Streptococcus gordonii*.

45 Usando el programa en línea BLAST presentado por NCBI, las secuencias se investigaron frente a bases de datos de secuencia proteica no redundante para generar una lista de enzimas con alta similitud de secuencia (>40 % de identidad) a la enzima de *Streptococcus gordonii*. La lista resultante incluía 18 candidatos.

Microorganismos	% de identidad con MDP descarboxilasa de <i>Streptococcus gordonii</i>	Número de acceso GenBank
<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 35037	75	EFE56694.1
<i>Leptotrichia goodfellowii</i> F0264	61	EEY36155.1
<i>Carnobacterium</i> sp. AT7	40	EDP67928.1

(continuación)

Microorganismos	% de identidad con MDP descarboxilasa de <i>Streptococcus gordonii</i>	Número de acceso GenBank
<i>Enterococcus faecium</i> TX1330	40	EEI60970.1
<i>Staphylococcus aureus</i> JH1	40	ABR51487.1
<i>Streptococcus agalactiae</i> NEM316	70	CAD47054.1
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	71	AAN58642.1
<i>Streptococcus uberis</i> 0140J	71	CAR41735.1
<i>Streptococcus infantarius subsp infantarius</i> ATCC BAA-102	71	EDT48420.1
<i>Streptococcus gallolyticus</i> UCN34	71	CBI13757.1
<i>Streptococcus dysgalactiae subsp equisimilis</i> GGS_124	71	BAH81333.1
<i>Streptococcus</i> sp. M143	76	EFA24040.1
<i>Streptococcus salivarius</i> SK126	74	EEK09252.1
<i>Streptococcus suis</i> 89/1591	40	EEF63672.1
<i>Streptococcus parasanguinis</i> ATCC 15912	73	EFH19018.1
<i>Streptococcus sanguinis</i> SK36	98	ABN43791.1
<i>Streptococcus</i> sp. 2_1_36FAA	98	EEY81027.1
<i>Streptococcus mitis</i> B6	74	CBJ22986.1

Las secuencias de las enzimas MDP descarboxilasa inferidas de los genomas de las anteriores especies así como del genoma de *S. gordonii* se generaron mediante concatenación de oligonucleótidos para fijar el uso de condón de *E. coli*. Un tramo de codones de 6 histidina se insertaron después del codón de iniciación de metionina para proporcionar una etiqueta de afinidad para la purificación. Por tanto, los genes sintetizados se clonaron en el vector de expresión pET25b (los vectores se construyeron por GENEART AG). Después de la transformación de la cepa de *E. coli* BL21(DE3), las proteínas se produjeron según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. A continuación, las enzimas se ensayaron usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, usando la MDP descarboxilasa de *Th. acidophilum* en lugar de la enzima de *P. torridus*. Este procedimiento de selección condujo a la identificación de enzimas más eficaces para la producción de isobuteno que la enzima de *S. gordonii* (Figura 9), en particular MDP descarboxilasas de *S. infantarius*, *S. gallolyticus*, *S. sp. M143*, *S. salivarius*, *S. suis*, *S. sanguinis* y *S. mitis*.

Ejemplo 5: Caracterización de la actividad de fosfotransferasa.

La liberación de ADP que está asociada con la producción de IBN de HIV se cuantificó usando el ensayo acoplado de piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa (Figura 10). Las MDP descarboxilasas de *P. torridus*, *Th. acidophilum*, *S. infantarius*, *S. mitis* se evaluaron para su capacidad para fosforilar HIV, liberando ADP.

La reacción enzimática estudiada se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones a 40 °C:

Tris-HCl 50 mM pH 7,0
MgCl₂ 10 mM
KCl 100 mM
ATP 5 mM
NADH 0,2 mM
Fosfoenolpiruvato 0,5 mM
3 U/ml de lactato deshidrogenasa
1,5 U/ml de piruvato quinasa
3-Hidroxiisovalerato (HIV) 0-50 mM

El pH se ajustó a 7,0

Cada ensayo se comenzó mediante la adición de la enzima particular (a una concentración de 0,05 a 1 mg/ml) y se hizo un seguimiento de la desaparición de NADH mediante el seguimiento de la absorbancia a 340 nm.

Los ensayos con MDP descarboxilasas del filo de *P. torridus* así como del género *Streptococcus* dio lugar a un incremento reproducible en la producción de ADP en presencia de HIV. La Figura 11 muestra un ejemplo de un gráfico Michaelis-Menten que corresponde a los datos recogidos para la enzima de *P. torridus*. Los parámetros cinéticos se muestran en la siguiente Tabla.

Las enzimas del filo de *P. torridus* mostraron mayores actividades de fosfotransferasa que las del género *Streptococcus*.

Organismo	K_M , mM	k_{cat} , sec^{-1}	$k_{cat}/K_M \times 10^{-3}$, $\text{mM}^{-1} \text{sec}^{-1}$
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	4,02	0,26	60
<i>Picrophilus torridus</i>	9,17	0,19	20
<i>Streptococcus mitis</i>	12,1	0,04	3
<i>Streptococcus infantarius</i>	13,4	0,03	2

Ejemplo 6: Producción de isobuteno a partir de 3-hidroxiisovalerato combinando dos enzimas.

La reacción enzimática deseada se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

Tris HCl 50 mM pH 7,5
MgCl₂ 10 mM
KCl 20 mM
ATP 40 mM
HIV 50 mM

El pH se ajustó a 7,5

100 µg de la MDP descarboxilasa de *Th. acidophilum* y 500 µg de la MDP descarboxilasa de *S. mitis* se añadieron a 1 ml de la mezcla de reacción. Las reacciones control con solamente una de las dos enzimas se corrieron en paralelo. Los ensayos se incubaron sin agitación a 37 °C en un vial sellado (Interchim).

La producción de IBN se midió analizando alícuotas muestreadas durante un periodo de incubación de 142 horas.

Un ml de la fase gaseosa se recogió y se inyectó en un cromatógrafo de gases HP5890 (HP) equipado con un detector FID y una columna CP SilicaPlot (Varian). Se usó isobuteno comercial como referencia.

Las cinéticas de producción de isobuteno se muestran en la Figura 12. La MDP descarboxilasa de *Th. acidophilum* catalizaron la producción de isobuteno de HIV. La adición de MDP descarboxilasa de *S. mitis* condujeron a un incremento 3 veces de la producción de isobuteno después de 142 h de incubación.

La MDP descarboxilasa de *S. mitis* sola produjo solamente pequeñas cantidades de isobuteno después de 6 días de incubación, indicando una baja actividad de fosfotransferasa.

Por lo tanto, la producción de isobuteno se puede incrementar combinando dos tipos de enzimas que realizan complementariamente las dos etapas de reacción.

Ejemplo 7: Efecto del ATP sobre la producción de isobuteno de 3-fosfonoxiisovalerato (PIV).

El compuesto 3-fosfonoxiisovalerato (PIV) se sintetizó químicamente a partir de 3-hidroxiisovalerato según el esquema representado en la Figura 13 por SYNTHÉVAL (Francia).

Los ensayos de la producción de isobuteno se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones:

Tris-HCl 50 mM pH 7,5
MgCl₂ 10 mM
KCl 20 mM
ATP 0 mM (ensayo N.º1 y N.º2)
ATP 10 mM (ensayo N.º3 y N.º4)
3-Fosfonoxiisovalerato 25 mM

El pH se ajustó a 7,5

La reacción se inició mediante la adición de 2 mg de MDP descarboxilasa purificada de *S. mitis* a 0,5 ml de la mezcla de reacción. Las reacciones control se corrieron en ausencia de enzima (ensayos N.º1 y N.º3).

La mezcla se incubó sin agitación a 37 °C durante 26 h en un vial sellado de 2 ml (Interchim).

Un ml de la fase gaseosa se recogió y se inyectó en un cromatógrafo de gases Varian 430-GC equipado con un detector FID y una columna CP SilicaPlot (Varian). Se usó isobuteno comercial como referencia.

La adición de ATP 10 mM a la mezcla de reacción incrementó 120 veces la producción de isobuteno a partir de 3-fosfonoxiisovalerato (PIV) (Figura 14).

Ejemplo 8: Parámetros cinéticos de la producción de isobuteno a partir de 3-fosfonoxiisovalerato (PIV).

Los parámetros cinéticos de la producción de isobuteno se midieron bajo las siguientes condiciones:

Tris-HCl 50 mM pH 7,5

MgCl₂ 10 mM
 KCl 50 mM
 ATP 40 mM
 3-Fosfonoxiisovalerato 0-100 mM

5 El pH se ajustó a 7,5

La reacción se inició mediante la adición de 1 mg de MDP descarboxilasa purificada de *S. mitis* a 0,5 ml de la mezcla de reacción. A continuación, la mezcla se incubó sin agitación a 37 °C durante 44 h en un vial sellado de 2 ml (Interchim).

10 Un ml de la fase gaseosa se recogió y se inyectó en un cromatógrafo de gases Varian 430-GC equipado con un detector FID y una columna CP SilicaPlot (Varian). Se usó isobuteno comercial como referencia.

Los ensayos con MDP descarboxilasa de *S. mitis* mostraron un incremento 160-400 veces en la producción de IBN sobre el nivel anterior (descomposición espontánea de 3-fosfonoxiisovalerato) en presencia de ATP como cofactor (véase la siguiente Tabla).

Concentración de PIV, mM	Área del pico, unidades arbitrarias	
	No enzima	2 mg/ml de enzima
25	164,9	26945,2
50	328,7	65720,4
75	561,5	239249,2
100	2078,7	339363,7

15 Se encontró que la MDP descarboxilasa de *S. mitis* tenía un K_M mayor que 60 mM y un k_{cat} de al menos $1,3 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Global Bioenergies, Scientist of Fortune S.A.

<120> Producción de alquenos mediante conversión enzimática combinada de ácidos 3-hidroxialcanoicos

<130> S1768 EP S3

20 <140> EP 11 78 4957.0

<141> 18-10-2011

<150> EP 10 18 8001.1

<151> 19-10-2010

<150> PCT/EP2011/068174

25 <150> 18-10-2011

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 324

30 <212> PRT

<213> *Picrophilus torridus*

<400> 1

ES 2 739 248 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	

ES 2 739 248 T3

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

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> 2

<211> 318

<212> PRT

5 <213> *Thermoplasma acidophilum*

<400> 2

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

Val Leu Leu Gly Gly Ile Ala Asn Pro Val Thr Arg Thr Pro Leu His
20 25 30

ES 2 739 248 T3

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

ES 2 739 248 T3

275

280

285

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

Met Leu Arg Ile Val Gly Gly Ala Trp His Arg Arg Pro Glu
305 310 315

<210> 3

<211> 320

<212> PRT

<213> *Thermoplasma volcanium*

<400> 3

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

Val Leu Leu Gly Gly Ile Ala Asn Glu Lys Thr Arg Thr Pro Leu His
20 25 30

Thr Ser Ala Gly Ile Ala Tyr Thr Asp Ser Cys Gly Ser Ile Arg Thr
35 40 45

Glu Ser Thr Ile Tyr Gly Asp Ser Glu Met His Ile Tyr Phe Asn Gly
50 55 60

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

Tyr Arg Asn Glu Leu Gln Ser Phe Phe Gly Lys Lys Asp Val Ser Tyr
85 90 95

Ser Ser Leu Asn Tyr Gly Ile Leu Ser Gly Ser Ser Asp Ala Gly Ala
100 105 110

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

His Asp Ile Glu Asn Asp Ile Arg Met Ile Ser Glu Ser Ala Gly Arg
130 135 140

Ser Leu His Gly Gly Leu Thr Ile Thr Trp Ser Asp Gly Tyr Ser Ala
145 150 155 160

Tyr Thr Glu Arg Val Leu Gly Pro Glu His Phe Asn Asn Tyr Ala Ile
165 170 175

Val Gly Phe Ser Phe Asp Tyr Pro Arg Asn Pro Ser Asp Thr Ile His

ES 2 739 248 T3

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

<210> 4
 <211> 322
 <212> PRT
 <213> *Ferroplasma acidarmanus* fer1
 <400> 4

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

ES 2 739 248 T3

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

<210> 5
 <211> 315
 <212> PRT

ES 2 739 248 T3

<213> *Streptococcus gordonii*

<400> 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 Ala Thr Ala Thr Gly Asp Glu Phe Tyr Ile Asp Gly
50          55          60

Gln Leu Gln Ser Pro Ala Glu His Thr 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 Ala
115         120         125

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 739 248 T3

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 Leu 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> 6

<211> 315

<212> PRT

5 <213> *Streptococcus gordonii* str. Challis substr. CH1

<400> 6

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

ES 2 739 248 T3

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

<210> 7
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus infantarius subsp infantarius* ATCC BAA-102
 <400> 7

Met Asp Arg Lys Ile Val Thr Val Lys Ser Tyr Ala Asn Ile Ala Ile
 1 5 10 15
 Ile Lys Tyr Trp Gly Lys Ala Asp Ala Ala Lys Met Ile Pro Ala Thr
 20 25 30

ES 2 739 248 T3

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

ES 2 739 248 T3

Asp Leu Glu Arg Leu Thr Lys Arg Phe Glu Glu Asn Tyr Arg Val Ile
290 295 300

Val Ser Arg Thr Lys Glu Leu
305 310

<210> 8
<211> 400
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 8

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
180 185 190

ES 2 739 248 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9
<211> 319
<212> PRT
<213> *Lactobacillus delbrueckii*
<400> 9

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

ES 2 739 248 T3

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

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

ES 2 739 248 T3

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> 10

<211> 317

<212> PRT

<213> *Streptococcus mitis* (cepa B6)

5

<400> 10

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

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

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

Ser 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 Asn 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 Gly Leu Lys Leu Ala Met Ile Met Leu Val Leu
165 170 175

ES 2 739 248 T3

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 Val Tyr Leu Lys Ala Asn Asp Phe Ala Lys
 210 215 220
 Val 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
 245 250 255
 Ala Met Asp Phe Val Arg Gln Leu Arg Glu Gln Gly Glu Ala Cys Tyr
 260 265 270
 Phe Thr Met Asp Ala Gly Pro Asn Val Lys Val Leu Cys Gln Glu Lys
 275 280 285
 Asp Leu Glu His Leu Ser Glu Ile Phe Gly Gln Arg Tyr Arg Leu Ile
 290 295 300
 Val Ser Lys Thr Lys Asp Leu Ser Gln Asp Gly Cys Cys
 305 310 315

<210> 11
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus gallolyticus* UCN34

5

<400> 11

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

ES 2 739 248 T3

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

<210> 12

<211> 315

<212> PRT

<213> *Streptococcus sanguinis* SK36

ES 2 739 248 T3

<400> 12

Met	Asp	Arg	Lys	Pro	Val	Ser	Val	Lys	Ser	Tyr	Ala	Asn	Ile	Ala	Ile	1	5	10	15
Val	Lys	Tyr	Trp	Gly	Lys	Lys	Asp	Ala	Glu	Lys	Met	Ile	Pro	Ser	Thr	20	25	30	
Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Thr	Leu	Glu	Asn	Met	Tyr	Thr	Glu	Thr	Gln	Leu	35	40	45	
Ser	Pro	Leu	Pro	Asp	Thr	Ala	Thr	Gly	Asp	Glu	Phe	Tyr	Ile	Asp	Ser	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	
Gln	Glu	Leu	Ala	Gln	Leu	Ala	Lys	Phe	Ala	Ser	Gly	Ser	Ser	Ala	Arg	130	135	140	
Ser	Phe	Phe	Gly	Pro	Leu	Ala	Ala	Trp	Asp	Lys	Asp	Ser	Gly	Ala	Ile	145	150	155	160
Tyr	Pro	Val	Lys	Thr	Asp	Leu	Lys	Leu	Ala	Met	Ile	Met	Leu	Val	Leu	165	170	175	
His	Asp	Glu	Lys	Lys	Pro	Ile	Ser	Ser	Arg	Asp	Gly	Met	Glu	Leu	Cys	180	185	190	
Ala	Lys	Thr	Ser	Thr	Ile	Phe	Pro	Asp	Trp	Ile	Ala	Gln	Ser	Ala	Leu	195	200	205	
Asp	Tyr	Lys	Ala	Met	Leu	Ser	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				

ES 2 739 248 T3

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

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

<210> 13
<211> 317
<212> PRT
<213> *Streptococcus* sp. M143
<400> 13

Met	Asp	Arg	Lys	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 Thr Asp Ala Thr Ala Asp Ala Phe Tyr Ile Asn Gly
50 55 60

Gln Leu Gln Ser Glu Ala 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 Ser Gly Leu Ser
100 105 110

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

Ser Gln Leu Ala Gln Glu Ala Lys Phe Ala Ser Gly Ser Ser Ser Arg

ES 2 739 248 T3

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 Leu Tyr Leu Lys Glu Asn Asp Phe Ala Lys
210 215 220

Val 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
245 250 255

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

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

Asp Leu Glu His Leu Ser Glu Ile Phe Gly Gln Arg Tyr Arg Leu Ile
290 295 300

Val Ser Lys Thr Lys Asp Leu Ser Gln Asp Asp Cys Cys
305 310 315

<210> 14

<211> 341

<212> PRT

<213> *Streptococcus suis* 89/1591

<400> 14

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

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

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

ES 2 739 248 T3

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

ES 2 739 248 T3

Lys Val Leu Cys Arg Ala Ser Gln Met Asp Glu Leu Val Ala Glu Leu
290 295 300

Ala Lys Val Phe Pro Arg Glu Lys Ile Ile Thr Ser Lys Pro Gly Pro
305 310 315 320

Ala Ala Tyr Val Leu Ser Glu Asp Glu Trp Gln Thr Ser Gln Ala Ala
325 330 335

Phe Glu Lys Gly Leu
340

<210> 15

<211> 314

<212> PRT

<213> *Streptococcus salivarius* SK126

5

<400> 15

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 Ala Asp Ala Glu Arg Met Ile Pro Ser Thr
20 25 30

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

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

Glu Leu Gln Gly Glu Lys Glu Thr Thr Lys Ala Ser Lys Val Leu Asp
65 70 75 80

Leu Phe Arg Asn Asn Ser Asn Gln His Val Lys Ile Glu Thr Trp 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 Ala Asn Glu Leu Phe Gln Val Gly Lys Thr Gln
115 120 125

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

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

ES 2 739 248 T3

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

Thr Asp Gln Lys Lys Pro Val Ser Ser Arg Asp Gly Met Lys Leu Cys
180 185 190

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

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

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

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

Ala Met Asp Lys Val Lys Ala Leu Arg Ala Ser Gly Glu Gln 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 Arg Leu Ala Glu His Phe Arg Lys Asp Tyr Gln Val Ile
290 295 300

Val Ser Arg Thr Lys Glu Leu Pro Asp Ala
305 310

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de alqueno, **caracterizado porque** comprende la conversión de un 3-hidroxiacanoato en dicho alqueno por

- (i) una primera enzima que tiene una actividad de conversión del 3-hidroxiacanoato en el correspondiente 3-fosfonoxiacanoato; y
- (ii) una segunda enzima que es diferente de la primera enzima y que tiene una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxiacanoato en dicho alqueno mediante descarboxilación y desfosforilación.

2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que

- (i) la primera enzima que tiene una actividad de conversión del 3-hidroxiacanoato en el correspondiente 3-fosfonoxiacanoato se selecciona del grupo que consiste en

(A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y que muestra una actividad de conversión del 3-hidroxiacanoato en el correspondiente 3-fosfonoxiacanoato que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1;

(B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y que muestra una actividad de conversión del 3-hidroxiacanoato en el correspondiente 3-fosfonoxiacanoato que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2;

(C) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 y que muestra una actividad de conversión del 3-hidroxiacanoato en el correspondiente 3-fosfonoxiacanoato que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; y

(D) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 4 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 y que muestra una actividad de conversión del 3-hidroxiacanoato en el correspondiente 3-fosfonoxiacanoato que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que

- (ii) la segunda enzima que tiene una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxiacanoato en dicho alqueno seleccionada del grupo que consiste en

(a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxiacanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5;

(b) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 6 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxiacanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6;

(c) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 7 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxiacanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7;

(d) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 8 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxiacanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8;

(e) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 9 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxiacanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9

(f) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos

mostrada en la SEQ ID NO: 10 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10;

(g) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 11 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11;

(h) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 12 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12;

(i) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 13 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13;

(j) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 14 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14; y

(k) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 15 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 15 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 15.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la etapa de conversión de 3-hidroxipropionato en etileno.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la etapa de conversión de 3-hidroxibutirato en propileno.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la etapa de conversión de 3-hidroxisvalerato en 1-butileno.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la etapa de conversión de 3-hidroxi-3-metilbutirato en isobutileno.

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la etapa de conversión de 3-hidroxi-3-metilvalerato en isoamileno.

9. El procedimiento de una cualquiera de las anteriores reivindicaciones, **caracterizado porque** la etapa de conversión se lleva a cabo *in vitro*, en un sistema exento de células.

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 **caracterizado porque** el procedimiento se lleva a cabo en presencia de un microorganismo que produce de manera recombinante ambas de dichas enzimas como se han definido en (i) y (ii) de la reivindicación 1.

11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por** el uso de una planta, célula animal, célula vegetal o microorganismo que produce de manera recombinante ambas de dichas enzimas como se han definido en (i) y (ii) de la reivindicación 1.

12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una etapa de recolección de alquenos gaseosos que salen de la reacción por desgasificación.

13. Una planta, célula animal, célula vegetal o un microorganismo que produce de manera recombinante al menos dos enzimas, en las que una enzima se selecciona de (i) y la otra enzima se selecciona de (ii), en las que (i) y (ii) son como sigue:

(i) una primera enzima que tiene una actividad de conversión del 3-hidroxialcanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato; y

(ii) una segunda enzima que es diferente de la primera enzima y que tiene una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno.

14. Una composición que comprende el microorganismo de la reivindicación 13, un medio de cultivo adecuado y un

compuesto 3-hidroxialcanoato o una fuente de carbono que se puede convertir por el microorganismo a un compuesto 3-hidroxialcanoato.

15. Uso de una combinación de al menos dos enzimas, en las que una enzima se selecciona del siguiente (i) y la otra enzima se selecciona del siguiente (ii) o de un microorganismo de la reivindicación 13 o de una composición de la reivindicación 14, para producir compuestos alqueno a partir de 3-hidroxialcanoatos, en el que (i) y (ii) son como sigue:

(i) una primera enzima que tiene una actividad de conversión del 3-hidroxialcanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato; y

(ii) una segunda enzima que es diferente de la primera enzima y que tiene una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno.

16. El uso de la reivindicación 14, en el que

(i) la primera enzima que tiene una actividad de conversión del 3-hidroxialcanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato se selecciona del grupo que consiste en

(A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y que muestra una actividad de conversión del 3-hidroxialcanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1;

(B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y que muestra una actividad de conversión del 3-hidroxialcanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2;

(C) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 y que muestra una actividad de conversión del 3-hidroxialcanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; y

(D) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 4 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 y que muestra una actividad de conversión del 3-hidroxialcanoato en el correspondiente 3-fosfonoxialcanoato que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4.

17. El uso de la reivindicación 15 o 16, en el que

(ii) la segunda enzima que tiene una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno seleccionada del grupo que consiste en

(a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5;

(b) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 6 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6;

(c) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 7 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7;

(d) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 8 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8;

(e) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 9 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de

aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9;

(f) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10;

(g) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 11 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11;

(h) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 12 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12;

(i) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 13 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13;

(j) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 14 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14; y

(k) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 15 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 15 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 15 y que muestra una actividad de conversión de dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es al menos tan alta como la correspondiente actividad de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 15.

18. Un procedimiento de producción de un alqueno que comprende la etapa de convertir enzimáticamente un 3-fosfonoxialcanoato en el correspondiente alqueno mediante el uso de una enzima que puede catalizar la conversión por descarboxilación y desfosforilación, en el que dicho 3-fosfonoxialcanoato, en una primera etapa, se produce por una enzima diferente.

19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o el procedimiento de la reivindicación 18, **caracterizado porque** el procedimiento se lleva a cabo con ATP, dATP, ADP, AMP, un NTP distinto a ATP, un dNTP o pirofosfato como cosustrato.

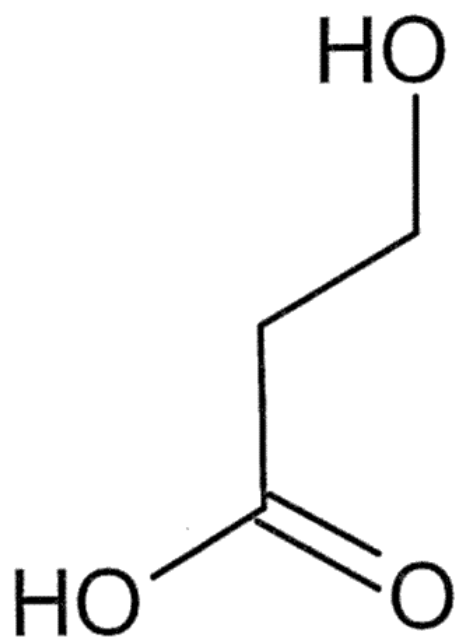


Figura 1

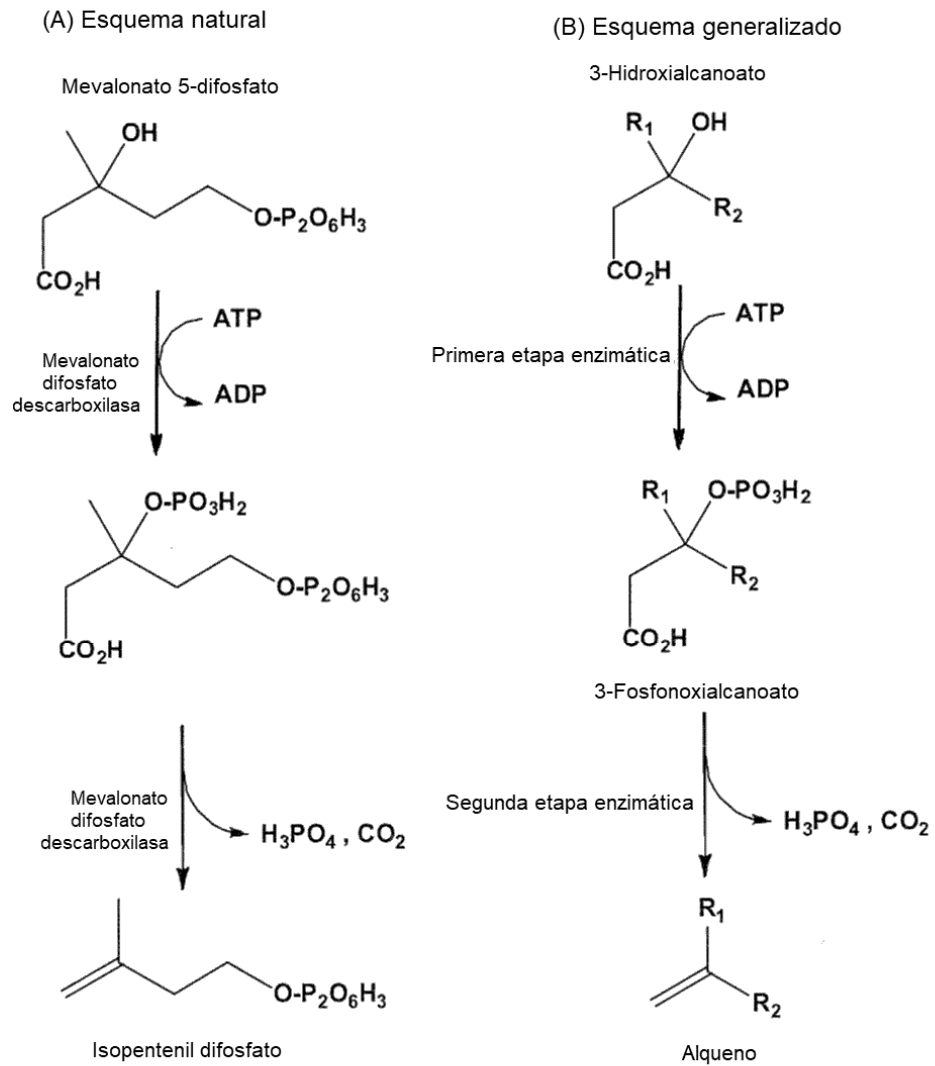
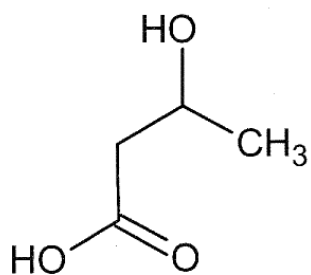
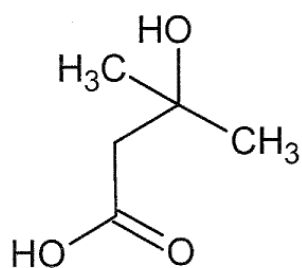


Figura 2

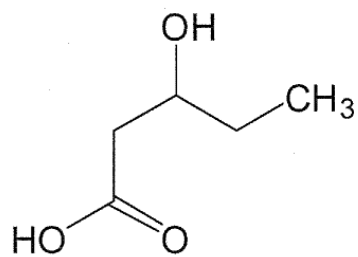
Reacción catalizada por mevalonato difosfato descarboxilasa EC 4.1.1.33



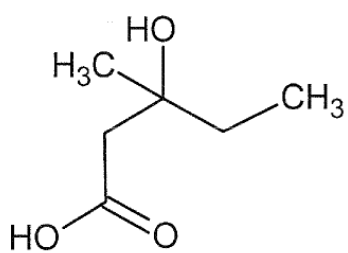
3-hidroxibutirato



3-hidroxi-3-metilbutirato



3-hidroxivalerato



3-hidroxi-3-metilvalerato

Figura 3

Figura 4

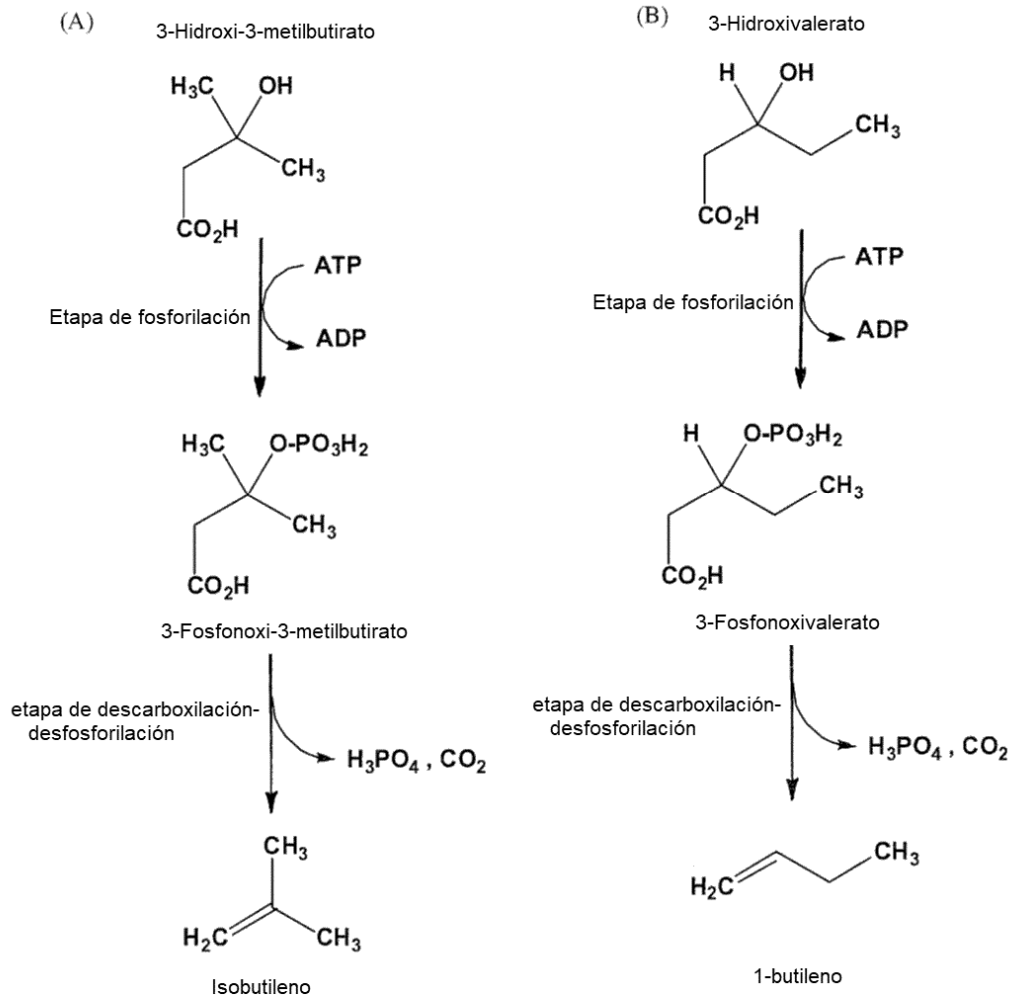


Figura 4 (cont.)

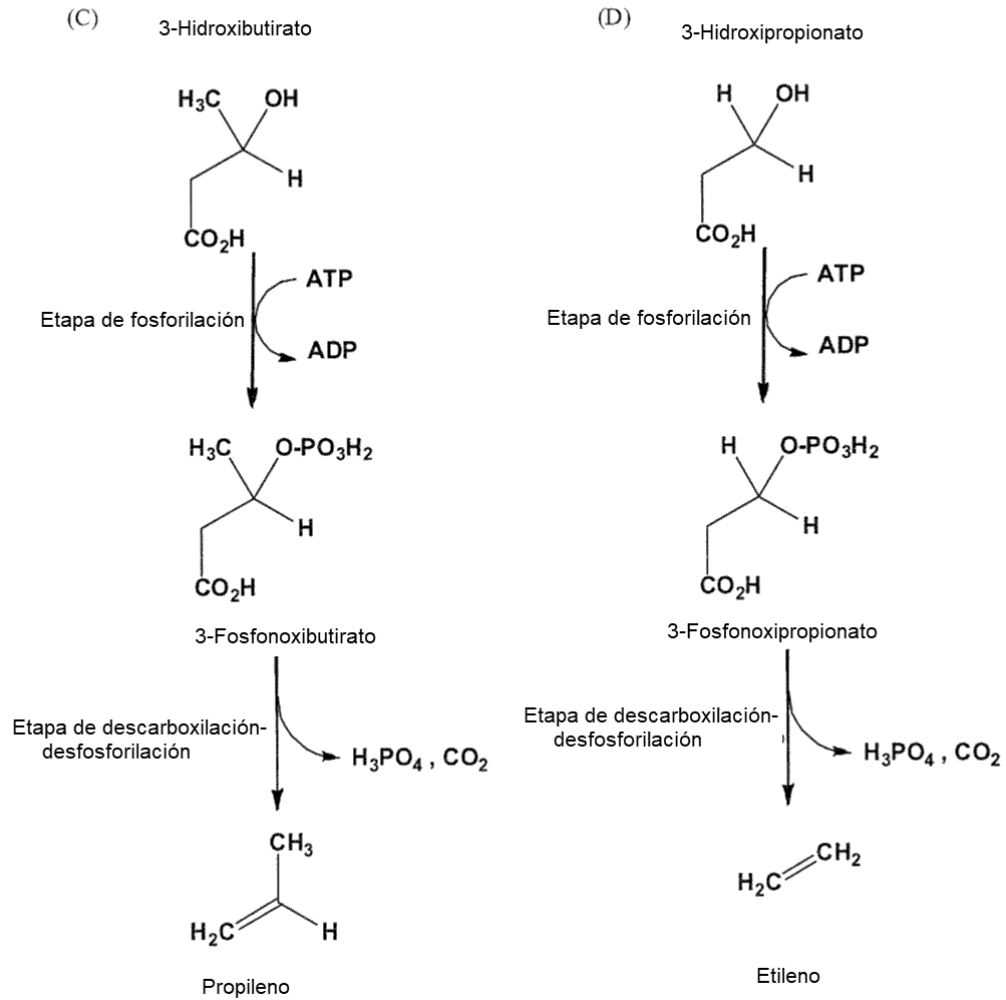
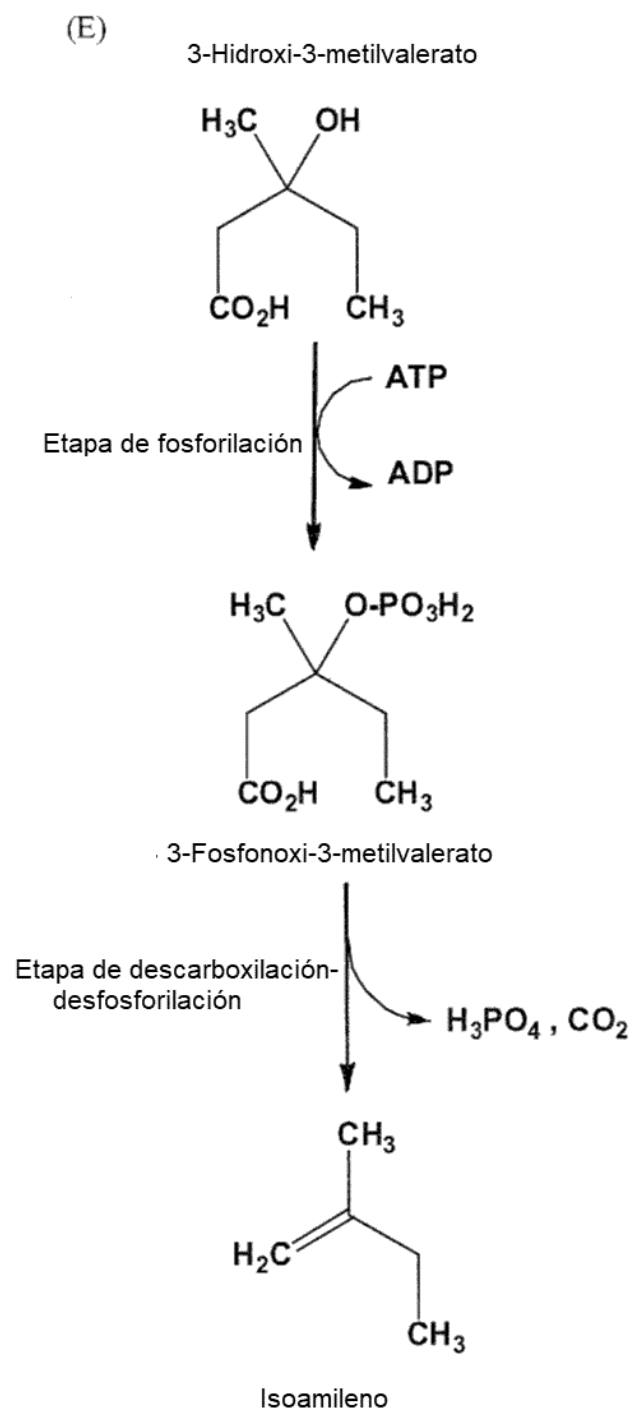
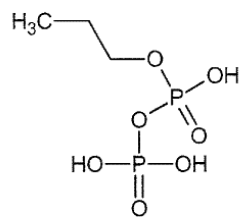
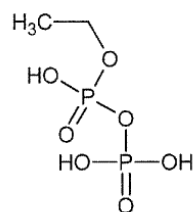


Figura 4 (cont.)

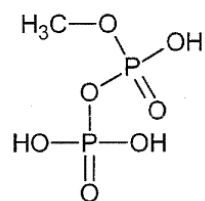




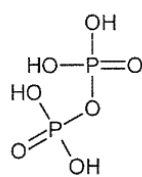
Propanol difosfato



Etanol difosfato



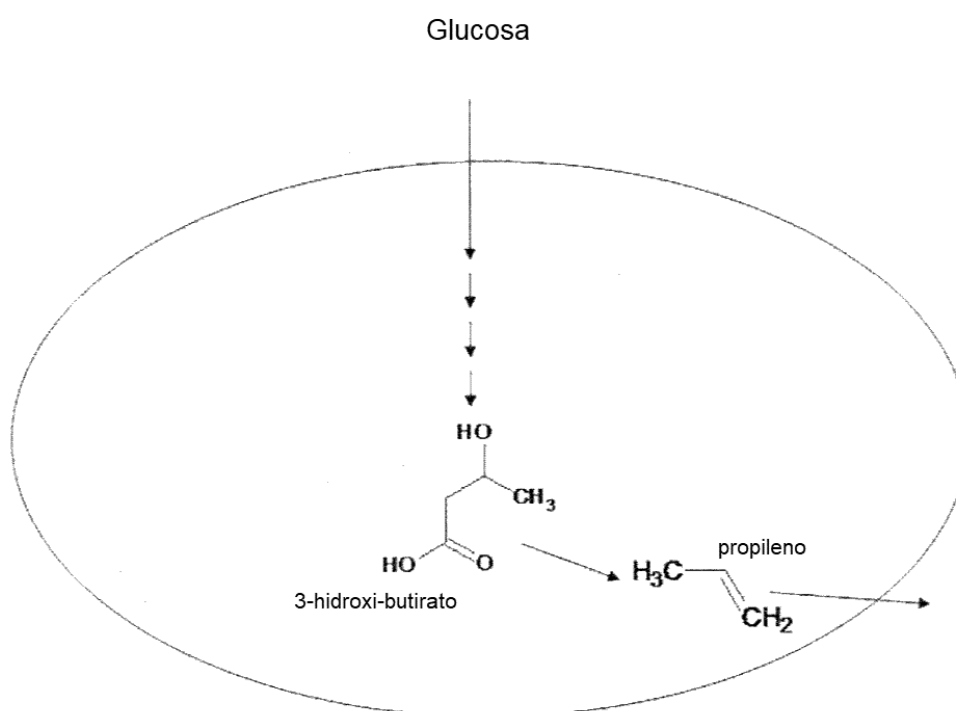
Metanol difosfato



Pirofosfato

Figura 5

Figura 6



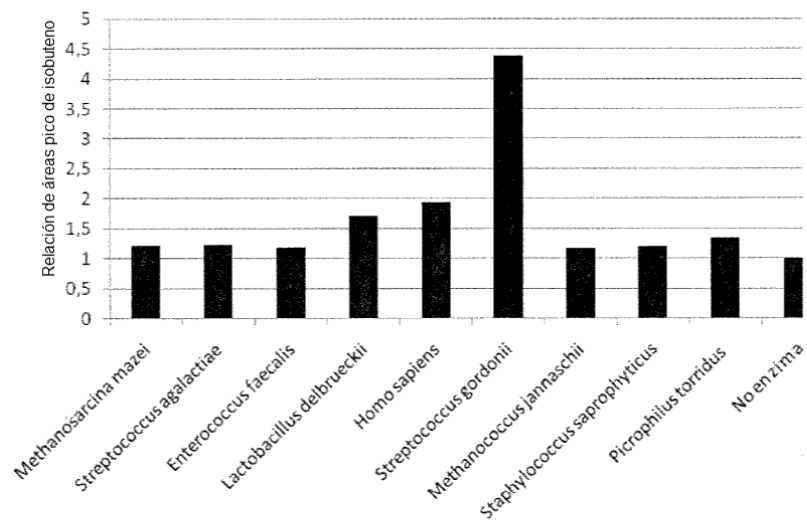


Figura 7

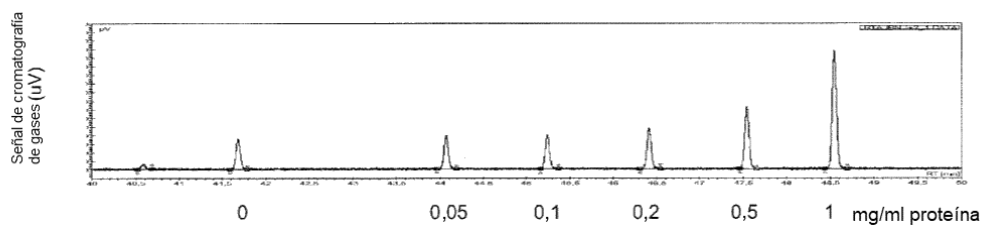


Figura 8

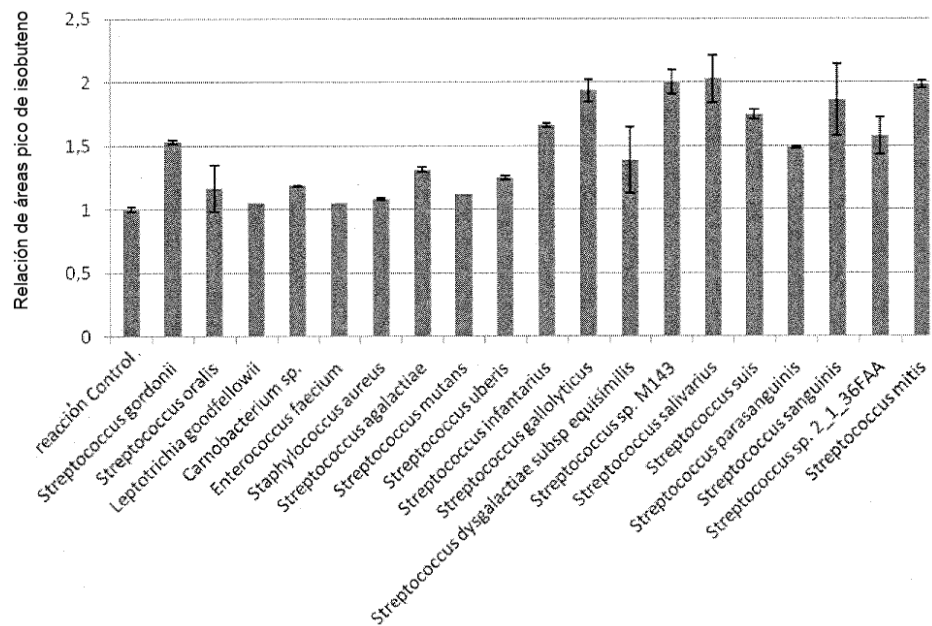


Figura 9

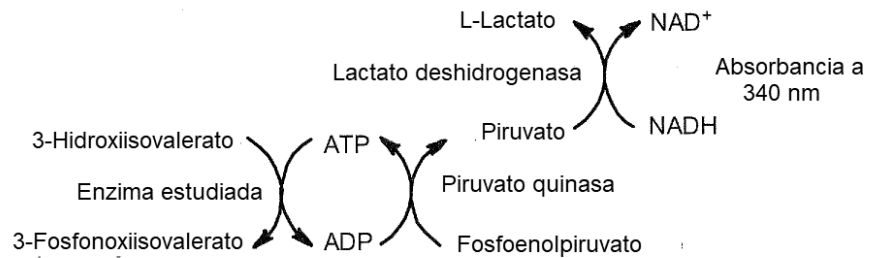


Figura 10

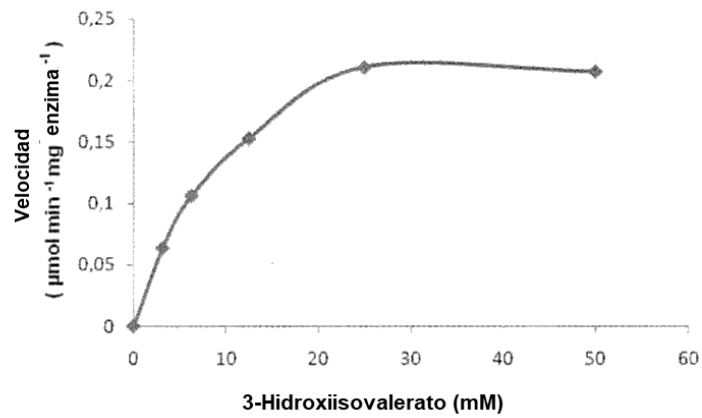


Figura 11

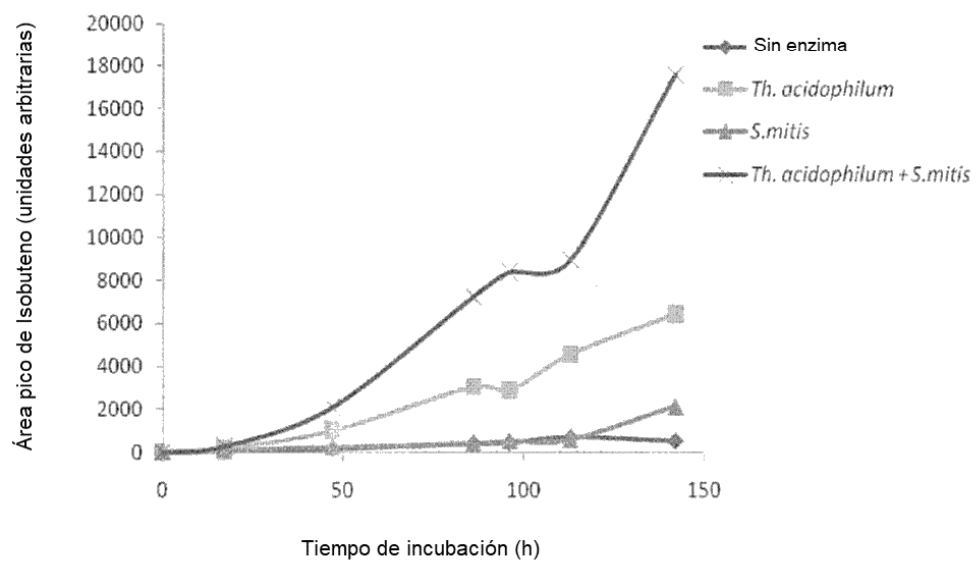


Figura 12

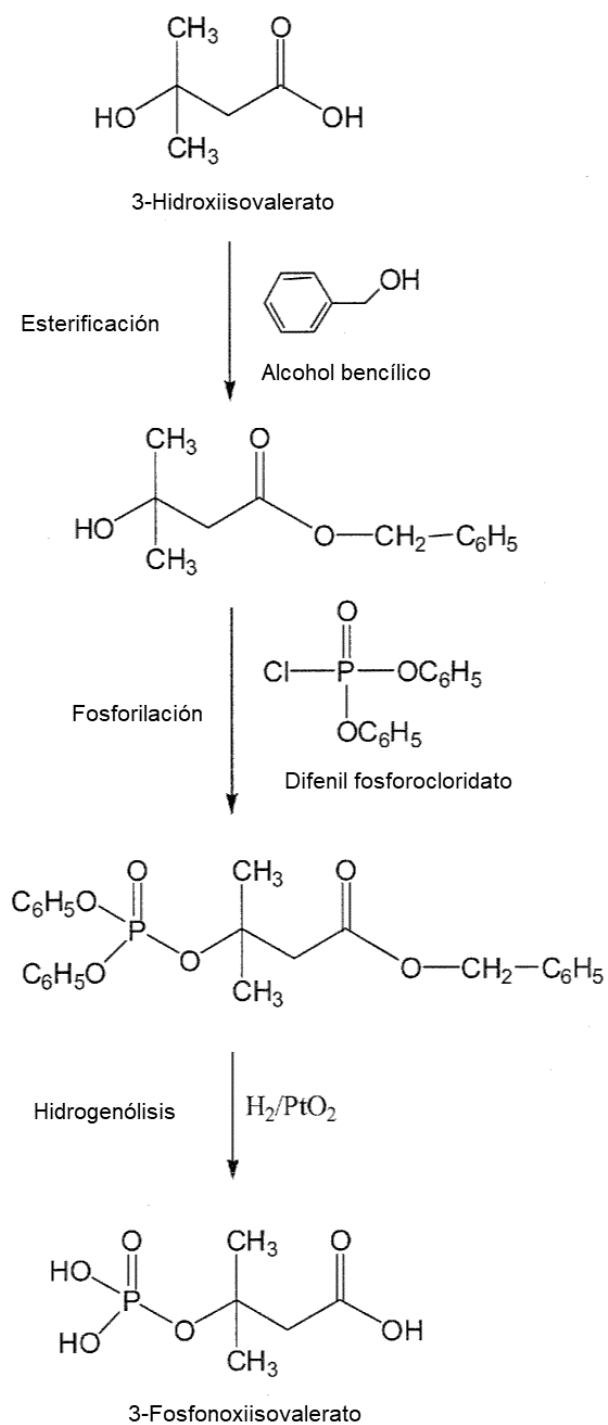


Figura 13

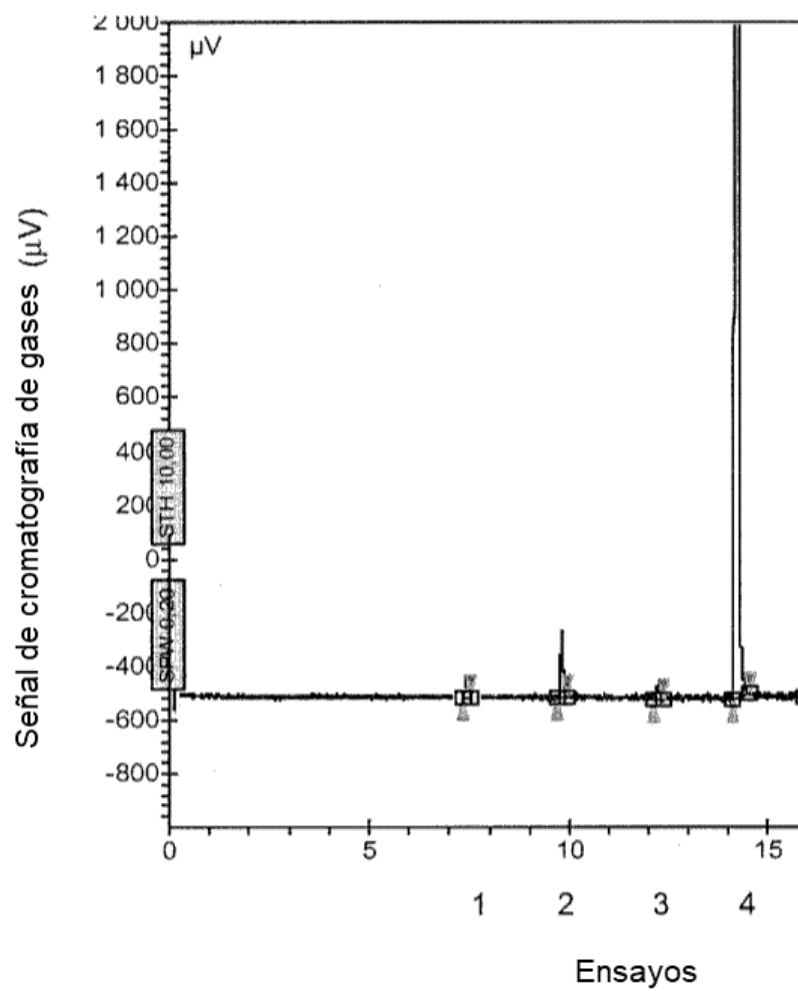


Figura 14