

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 911**

51 Int. Cl.:

C12P 7/04 (2006.01)

C12P 7/16 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2016 PCT/EP2016/064504**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2016 WO16207267**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2016 E 16736807 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3313998**

54 Título: **Procedimiento de producción enzimática de alcohol isoamílico**

30 Prioridad:

26.06.2015 EP 15174104

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

24.03.2020

73 Titular/es:

**GLOBAL BIOENERGIES (100.0%)
5, rue Henri Desbruères
91000 Evry , FR**

72 Inventor/es:

**ANISSIMOVA, MARIA y
ALLARD, MATHIEU**

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 2 749 911 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción enzimática de alcohol isoamílico

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico (3-metilbutan-1-ol) que comprende la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA (isovaleril-CoA) en alcohol isoamílico, que comprende: (a) dos etapas enzimáticas que comprenden (i) primero la conversión enzimática de la 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído (3-metilbutanal o isovaleraldehído); y (ii) luego la conversión enzimática del 3-metilbutiraldehído así obtenido en dicho alcohol isoamílico; o (b) una única reacción enzimática en la que la 3-metilbutiril-CoA se convierte directamente en alcohol isoamílico utilizando una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84). Además, la presente invención se refiere al procedimiento anterior en el que la 3-metilbutiril-CoA se puede proporcionar mediante la conversión enzimática de la 3-metilcrotonil-CoA en dicha 3-metilbutiril-CoA como se describe en el presente documento. El alcohol isoamílico así obtenido se puede convertir enzimáticamente de manera adicional en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo) como se describe en el presente documento. La presente invención también se refiere a organismos recombinantes o microorganismos que sean capaces de llevar a cabo las conversiones enzimáticas anteriores. Además, la presente invención se refiere a los usos de las enzimas y combinaciones de enzimas que permiten las conversiones enzimáticas anteriores.

El alcohol isoamílico (también llamado 3-metilbutan-1-ol o isopentanol) es un alcohol alifático. El alcohol isoamílico es un químico muy importante utilizado comúnmente como disolvente de grasas, aceites, resinas y alcaloides. Existe una demanda de alcohol isoamílico en la industria de la perfumería, por ejemplo, en la fabricación del salicilato de isoamilo utilizando en las fragancias del jabón y cosméticos. También se utiliza en la fabricación de ácido fosfórico. Además, se utiliza en la síntesis de piretroides. El alcohol isoamílico se utiliza también como material en bruto para la preparación de sabores sintéticos de melocotón, plátano, cereza, ciruela verde, malta, naranja, pasa y güisqui, y en la producción de aceite de plátano sintético. Se utilizan distintos derivados de alcohol isoamílico, es decir, ésteres isoamílicos como fragancias como, por ejemplo, acetato de isoamilo, acetoacetato de isoamilo, benzoato de isoamilo, butirato de isoamilo, cinamato de isoamilo, formato de isoamilo, 2-furanbutirato de isoamilo; furfuralpropionato de [alfa]-isoamilo, 2-furanpropionato de isoamilo, furfuralacetato de [alfa]-isoamilo, hexanoato de isoamilo, isobutirato de isoamilo, isovalerato de isoamilo, laurato de isoamilo, 2-metilbutirato de isoamilo, 2-metilbutirato de isopentilo, nonanoato de isoamilo, octanoato de isoamilo, fenilacetato de isoamilo y propionato de isoamilo.

Los procedimientos comerciales para la producción de alcohol isoamílico incluyen el fraccionamiento de fueloil, cloración de alcanos con la hidrólisis posterior para producir una mezcla de isómeros y un proceso oxo de presión baja o hidroformilación de n-butenos seguido por la hidrogenación del isovaleraldehído resultante.

Una forma para biosintetizar el alcohol isoamílico se ha descrito recientemente (documento WO 2011/076261). Más específicamente, en el documento WO 2011/076261, se describe un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico que comprende un procedimiento para la producción de isoprenol utilizando mevalonato como sustrato y se convierte enzimáticamente mediante una etapa de descarboxilación en isoprenol y que comprende adicionalmente la etapa de la con versión del isoprenol así producido en alcohol isoamílico.

Además, se ha descrito recientemente la producción microbiana de ésteres, incluyendo el acetato de isoamilo a partir del alcohol isoamílico y acetyl-CoA (documento WO 2015/031859). Más específicamente se ha descrito que el alcohol isoamílico se biosintetiza a partir del α -cetoisocaproato mediante el 3-metilbutiraldehído utilizando una α -cetoácido descarboxilasa (2-cetoácido descarboxilasa) y una reacción posterior que utilizaba una alcohol deshidrogenasa que cataliza la conversión de 3-metilbutiraldehído en alcohol isoamílico, aunque también se describe que dicho alcohol isoamílico también se puede convertir adicionalmente entonces enzimáticamente en acetato isoamílico.

Recientemente, se han descrito genes, rutas metabólicas, y procedimientos para producir el alcohol isoamílico compuesto a partir de materia prima renovable utilizando una ruta metabólica de origen natural, aunque se ha sugerido que este compuesto es un biocombustible avanzado (documento WO 2009/076480). Además, se ha descrito recientemente la biosíntesis de alcohol isoamílico a partir de glucosa en células modificadas de *E. coli* utilizando las rutas biosintéticas de aminoácidos del huésped incluyendo la ruta anabólica de la L-leucina; *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008), 5769-5775; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86 (2010), 1155-1164. La etapa clave de estas rutas metabólicas naturales incluye la descarboxilación de un alfa-cetoácido (2-ceto-isocaproato) en 3-metilbutanal como se ilustra en la Figura 1. Ya se conocían, en la técnica anterior estas cepas modificadas metabólicamente que utilizan las rutas nativas para producir niveles de alcohol isoamílico que siguen siendo demasiado bajas para aplicaciones industriales inmediatas.

Otra razón para la demanda creciente de alcohol isoamílico es el hecho de que el alcohol isoamílico también se puede utilizar como molécula de partida para el acetato de isoamilo. El acetato de isoamilo, también conocido como acetato de isopentilo, es un compuesto orgánico que es el éster formado a partir del alcohol isoamílico y el ácido acético. Es un líquido incoloro que es solo ligeramente soluble en agua, pero muy soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos. El acetato de isoamilo tiene un fuerte olor que también se describe como similar al del plátano y la pera. El acetato de isoamilo se utiliza particularmente para transmitir un sabor a plátano, por ejemplo, en alimentos. La bioconversión del alcohol isoamílico exógeno en acetato de isoamilo se ha descrito recientemente en *E. coli* modificada

utilizando el gen ATF2 de *S. cerevisiae* (de la alcohol O-acetil transferasa) (Appl. Microbiol. Biotechnol. 63 (2004), 698-704). En esta bioconversión, el alcohol isoamílico y la acetil-CoA se acoplan para dar como resultado la forma de éster, es decir, el acetato de isoamilo. El acetato de isoamilo no solo se utiliza ampliamente en la industria de saborizantes debido al aroma a plátano característico, sino que también se puede utilizar como un biocombustible.

- 5 Anteriormente, un artículo de revisión describió la transformación de biomasa en sustancias químicas industriales utilizando enzimas o células (Chemical Reviews 114 (2013), 1871-1908), en el que se desvelan, i. a., las reacciones de butiril-CoA a butiraldehído y butanol, y 4-hidroxibutiril a 4-hidroxibutanal y 1,4-butanodiol.

En consecuencia, debido a las numerosas aplicaciones del alcohol isoamílico (o acetato de isoamilo) hay una demanda creciente de este compuesto. Por lo tanto, existe una necesidad creciente para proporcionar procedimientos alternativos para la producción respetuosa con el medio ambiente, barata y simple de alcohol isoamílico (y acetato de isoamilo).

La presente invención satisface esta demanda de un procedimiento alternativo para la producción enzimática de acetato de isoamilo y, en particular, su precursor, el alcohol isoamílico que perite la producción de alcohol isoamílico (y acetato de isoamilo) in vitro o in vivo en un microorganismo y otras especies, en particular proporcionando el objeto materia como se narra en las reivindicaciones.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico (3-metilbutan-1-ol) que comprende la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico, que comprende: (a) dos etapas enzimáticas que comprenden (i) primero la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído utilizando una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87); y (ii) luego la conversión enzimática de 3-metilbutiraldehído así obtenido en dicho alcohol isoamílico; o (b) una única reacción enzimática en la que la 3-metilbutiril-CoA se convierte directamente en alcohol isoamílico utilizando una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/ acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84).

En consecuencia, la presente invención se refiere a lo siguiente:

1. Un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico (3-metilbutan-1-ol) que comprende la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico, que comprende:

30 (a) dos etapas enzimáticas que comprenden

(i) primero la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído utilizando una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87); y

(ii) luego la conversión enzimática del 3-metilbutiraldehído así obtenido en dicho alcohol isoamílico; o

(b) una única reacción enzimática en la que la 3-metilbutiril-CoA se convierte directamente en alcohol isoamílico utilizando una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/ acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84).

40 2. El procedimiento del artículo 1, en el que la conversión enzimática de dicho 3-metilbutiraldehído en dicho alcohol isoamílico se consigue utilizando una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH o NADPH como donante.

3. El procedimiento del artículo 1 o 2, que comprende adicionalmente la provisión de la 3-metilbutiril-CoA mediante la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en dicha 3-metilbutiril-CoA.

45 4. El procedimiento del artículo 3, en el que la conversión enzimática 3-metilcrotonil-CoA en dicha 3-metilbutiril-CoA se consigue utilizando una enzima que se clasifica como EC 1.3.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH.

5. El procedimiento del artículo 4, en el que la enzima se selecciona de entre el grupo que consiste en

- 50 (i) una acil-CoA deshidrogenasa (NADP+) (EC 1.3.1.8);
 (ii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.10);
 (iii) una cis-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.37);
 (iv) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.38);
 (v) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Re) (EC 1.3.1.39);
 (vi) crotonil-CoA reductasa (EC 1.3.1.86);

- (vii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADH) (EC 1.3.1.9);
- (viii) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD⁺) (EC 1.3.1.44); y
- (ix) una isovaleril-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.8.4).

5 6. El procedimiento de uno cualquiera de los artículos 1 a 5, que comprende adicionalmente la conversión enzimática del alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo).

7. El procedimiento del artículo 6, en el que la conversión enzimática del alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo) se consigue utilizando una alcohol-O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.84).

10 8. Un procedimiento para la producción de 3-metilbutiraldehído que comprende la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído, en el que la conversión enzimática de dicho 3-metilbutiril-CoA en dicho 3-metilbutiraldehído se consigue utilizando una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante (EC 1.2.1.-), en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87).

9. Un organismo o microorganismo recombinante que expresa

15 (i) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de dicha 3-metilbutiril-CoA en dicho 3-metilbutiraldehído es una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87);

20 (ii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilbutiraldehído en alcohol isoamílico;

(iii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA; y

(iv) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA.

25 10. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con el artículo 9, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de dicho 3-metilbutiraldehído en dicho alcohol isoamílico es una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH o NADPH como donante.

30 11. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con el artículo 9, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de la 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA es una enzima que es una 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.4), geranoil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.5) o una glutaconil-CoA decarboxilasa (EC 4.1.1.70).

12. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con el artículo 9, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de dicha 3-metilcrotonil-CoA en dicha 3-metilbutiril-CoA de acuerdo con (iv) es una enzima que se clasifica como EC 1.3.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH.

35 13. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con el artículo 12, en el que la enzima se selecciona de entre el grupo que consiste en

- (i) una acil-CoA deshidrogenasa (NADP⁺) (EC 1.3.1.8);
- (ii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.10);
- (iii) una cis-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.37);
- (iv) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.38);
- (v) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Re) (EC 1.3.1.39);
- (vi) crotonil-CoA reductasa (EC 1.3.1.86);
- (vii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADH) (EC 1.3.1.9);
- (viii) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD⁺) (EC 1.3.1.44); y
- (ix) una isovaleril-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.8.4).

14. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 9 a 13 que expresa adicionalmente una enzima capaz de la conversión enzimática del alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo).

50 15. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con el artículo 14, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo) es una alcohol-O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.84).

16. Un organismo o microorganismo recombinante que expresa

- (i) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84);

- (ii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA; y
- (iii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA.

17. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con el artículo 16, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de dicha 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA de acuerdo con (ii) [etapa 5] es una enzima que se clasifica como EC 1.3.-.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH.

18. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con el artículo 17, en el que la enzima se selecciona de entre el grupo que consiste en

- (i) una acil-CoA deshidrogenasa (NADP+) (EC 1.3.1.8);
- (ii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.10);
- (iii) una cis-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.37);
- (iv) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.38);
- (v) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Re) (EC 1.3.1.39);
- (vi) crotonil-CoA reductasa (EC 1.3.1.86);
- (vii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADH) (EC 1.3.1.9);
- (viii) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD⁺) (EC 1.3.1.44); y
- (ix) una isovaleril-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.8.4).

19. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con el artículo 16, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de la 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA de acuerdo con (iii) es una enzima que es una 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.4), geranoil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.5) o una glutaconil-CoA decarboxilasa (EC 4.1.1.70).

20. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 16 a 19 que expresa adicionalmente una enzima capaz de la conversión enzimática del alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo).

21. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con el artículo 20, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo) es una alcohol-O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.84).

22. El uso de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), para la conversión de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído.

23. El uso

- (i) de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), y una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH o NADPH como donante, o
- (ii) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84)

para la conversión de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico.

24. El uso de una combinación que comprende

- (i) una oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-.-), y
- (ii) una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), y una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con NADH o NADPH como donante, o
- (iii) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84);

para la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en alcohol isoamílico.

25. El uso del artículo 24, en el que la oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-.-) de acuerdo con (i) se selecciona de entre el grupo que consiste en

- (i) una acil-CoA deshidrogenasa (NADP+) (EC 1.3.1.8);
(ii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.10);
(iii) una cis-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.37);
5 (iv) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.38);
(v) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Re) (EC 1.3.1.39);
(vi) crotonil-CoA reductasa (EC 1.3.1.86);
(vii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADH) (EC 1.3.1.9);
(viii) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD⁺) (EC 1.3.1.44); y
(ix) una isovaleril-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.8.4).
- 10 Por lo tanto, la presente invención no solo se refiere a un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico a partir de la 3-metilbutiril-CoA. Más bien, esta conversión se embebe preferentemente en una ruta para la producción de alcohol isoamílico (y/o acetato de isoamilo; también denominado acetato de 3-metilbutilo) partiendo de acetil-CoA que es un componente central y una molécula clave importante en el metabolismo utilizada en muchas reacciones bioquímicas.
- 15 Por lo tanto, la presente invención puede comprender etapas adicionales y también se refiere a la ruta que se inicia a partir de la acetil-CoA en el que dos moléculas de acetil-CoA se condensan enzimáticamente en acetoacetil-CoA que puede convertirse enzimáticamente de manera adicional en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. Adicionalmente, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA puede convertirse enzimáticamente en 3-metilglutaconil-CoA. Además, la 3-metilglutaconil-CoA producida de esta manera puede convertirse enzimáticamente de manera adicional en 3-metilcrotonil-CoA (también denominada 3-metilbut-2-enoil-CoA). Además, la 3-metilcrotonil-CoA producida de esta manera puede convertirse enzimáticamente en 3-metilbutiril-CoA (también denominada isovaleril-CoA). La 3-metilbutiril-CoA producida puede convertirse enzimáticamente en alcohol isoamílico mediante vías alternativas. En una alternativa, la 3-metilbutiril-CoA producida puede convertirse enzimáticamente en 3-metilbutiraldehído (también denominado 3-metilbutanal o isovaleraldehído). El 3-metilbutiraldehído puede convertirse enzimáticamente en alcohol isoamílico (también denominado 3-metilbutanol o isopentanol). De manera alternativa, la 3-metilbutiril-CoA producida puede convertirse directamente en alcohol isoamílico mediante una única reacción enzimática. El alcohol isoamílico producido de esta manera se puede convertir en acetato de isoamilo. Las reacciones correspondientes se muestran esquemáticamente en la **Figura 2**.
- 20
25
- 30 Las partes de las reacciones que se muestran en la **Figura 2** ya se conocen. La biosíntesis de 3-metil-butiril-CoA a partir de acetil-CoA se han descrito recientemente (Angew. Chem. Int. Ed. 52 (2013), 1304-1308) mientras que se sabe que la ruta biosintética inversa a partir de la 3-metilbutiril-CoA a acetil-CoA se produce en *Pseudomonas* (FEMS Microbiol. Lett. 286 (2008), 78-84).

Conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico (etapas 6 y 7 o etapa 8 en la Figura 2)

- 35 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico (3-metilbutan-1-ol) que comprende la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico. De acuerdo con la presente invención, la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico se puede conseguir mediante diferentes vías, como se define en las reivindicaciones. Una posibilidad es la conversión de dos etapas mediante el 3-metilbutiraldehído. Otra opción implica la conversión directa de la 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico. Estas opciones se perfilarán a continuación y estas reacciones se ilustran esquemáticamente en la Figura 3.
- 40 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico (3-metilbutan-1-ol) que comprende la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico, que comprende:
- (a) dos etapas enzimáticas que comprenden
- (i) primero la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído (etapa 6 de la Figura 2) utilizando una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87); y
- 45 (ii) luego, la conversión enzimática del 3-metilbutiraldehído así obtenido en dicho alcohol isoamílico (etapa 7 en la Figura 2); o
- 50 (b) una única reacción enzimática en la que la 3-metilbutiril-CoA se convierte directamente en alcohol isoamílico utilizando una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/ acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) (etapa 8 en la Figura 2).

- 55 Por lo tanto, en una realización, la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico se puede conseguir mediante una conversión en dos etapas mediante el 3-metilbutiraldehído. En consecuencia, en una realización, la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico se consigue mediante dos etapas enzimáticas que comprenden (i) primero la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído (etapa 6 como se ilustra en la Figura 2); y (ii) luego, la conversión enzimática del 3-metilbutiraldehído así obtenido en dicho

alcohol isoamílico (etapa 7 como se ilustra en la Figura 2). La primera alternativa para la producción de alcohol isoamílico mediante la conversión en dos etapas se describe a continuación, mientras que la segunda alternativa, es decir, la conversión directa de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico se describe adicionalmente con posterioridad.

Conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído (etapa 6 en la Figura 2)

5 En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico, en el que la conversión enzimática de dicha 3-metilbutiril-CoA en dicho 3-metilbutiraldehído de acuerdo con (i) anteriormente (etapa 6 en la Figura 2) se consigue utilizando el uso de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.-. Estas enzimas son oxidorreductasas que catalizan la oxidación actuando sobre el grupo oxo del aldehído de donantes con NAD⁺ o NADP⁺ como receptor y que también son capaces de catalizar la reacción inversa, es decir, la reducción de un grupo tioéster de CoA de la acil-CoA utilizando NADH o NADPH como cofactor. En el contexto de la presente invención en la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído se utiliza la actividad reductasa de dicha enzima. En esta reacción, se reduce el tioéster de Coenzima A de la 3-metilbutiril-CoA, utilizando NADH o NADPH como donante, en el aldehído correspondiente, es decir, el 3-metilbutiraldehído (que también se denomina 3-metilbutanal o isovaleraldehído). La reacción correspondiente se puede conseguir mediante el uso de una enzima que se clasifica como (EC 1.2.1.-) y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante. Esta reacción se ilustra esquemáticamente en la **Figura 4**.

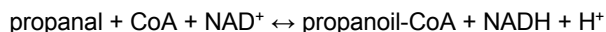
La conversión de 3-metilbutiril-CoA en dicho 3-metilbutiraldehído se consigue mediante el uso de una acetaldéhidó deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87).

Las acetaldéhidó deshidrogenasas (acetilación) (EC 1.2.1.10) catalizan naturalmente la siguiente reacción



Se ha descrito que esta enzima existe en varios organismos, en particular en bacterias. En una realización, la enzima es de una bacteria del género *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Giardia*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas* o *Thermoanaerobacter*. En una realización preferida, la enzima es de una bacteria de las especies *Acinetobacter* sp. HBS-2 (Número de acceso de UniProt A5JT11), *Burkholderia xenovorans* (Número de acceso de UniProt Q79AF6), *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium klyveri*, *E. coli*, *Giardia intestinalis*, *Leuconostoc mesenteroides* (Número de acceso de SwissProt Q5RLY6), *Propionibacterium freudenreichii*, *Pseudomonas* sp. (Número de acceso de SwissProt Q52060) o *Thermoanaerobacter ethanolicus*.

Las propanal deshidrogenasas (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87) catalizan naturalmente la siguiente reacción



30 Estas enzimas a menudo se codifican por el gen pduP y se ha descrito que existen en varios organismos, en particular en bacterias. El gen pduP es parte del operón de propanodiol (pdu) que está implicado en la utilización del propanodiol (J. Bacteriol. 181 (1999), 5967-5975). La ruta de la degradación del 1,2-propanodiol comienza con la conversión del 1,2-propanodiol en propionaldehído mediante la propanodiol deshidratasa dependiente de AdoCbl (como se puede derivar bajo los números de acceso de InterPro IPR003207, IPR003208, o IPR009204 de la base de datos de familias de proteínas de InterPro). El propionaldehído se oxida posteriormente por la propionaldehído deshidrogenasa para formar la propionil-CoA. Posteriormente, la propionil-CoA se puede metabolizar sea aeróbicamente en piruvato (presumiblemente en tres etapas) o anaeróbicamente en propionato (presumiblemente en dos etapas) (J. Bacteriol. 179 (1997), 1013-1022). El pduP está estrechamente relacionado con el EutE y se asume que es de una aldehído deshidrogenasa dependiente de la CoA que se utiliza en la ruta de pdu para la conversión del propionaldehído en propionil-CoA (J. Bacteriol. 181 (1999), 5967-5975).

En una realización, la enzima es de una bacteria del género *Burkholderia* o *Thermus*. En una realización preferida, la enzima es de una bacteria de la especie *Burkholderia xenovorans* (Número de acceso de UniProt Q79AF6) o *Thermus thermophilus* (Número de acceso de UniProt Q53WH9). En una realización más preferida, la enzima es de una bacteria de la especie *Klebsiella pneumoniae* subesp. *pneumoniae* (cepa ATCC 700721/ MGH 78578) (es decir, la deshidrogenasa dependiente de la CoA de *Klebsiella pneumoniae*; Número de acceso de Uniprot A6TDE3) o *Salmonella typhimurium* (es decir, la propionaldehído deshidrogenasa acilante de CoA de *Salmonella typhimurium*; Número de acceso de Uniprot H9L416).

La secuencia de la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) /propionaldehído deshidrogenasa dependiente de CoA de *Klebsiella pneumoniae* subesp. *pneumoniae* (cepa ATCC 700721 / MGH 78578) se muestra en la SEQ ID NO: 9. La secuencia de la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA)/propionaldehído deshidrogenasa acilante de CoA de *Salmonella typhimurium* se muestra en la SEQ ID NO: 10. En una realización particularmente preferida se puede utilizar cualquier proteína que presente una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10 o que presente una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 80 % homóloga a la de SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10 y tenga la actividad de una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) en la que dicha enzima sea capaz de catalizar la conversión enzimática de la 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído, en un procedimiento de acuerdo con la presente invención.

En una realización preferida dicha enzima tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10 o presenta una secuencia de aminoácidos que es al menos un x % homóloga a la SEQ ID NO: 9 o

la SEQ ID NO: 10 y tiene la actividad de la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) siendo x un número entero entre 30 y 100, preferentemente 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 en el que dicha enzima es capaz de la conversión de 3-metilbutiril-CoA en dicho 3-metilbutiraldehído como se ha expuesto anteriormente en el presente documento.

5 Con respecto a la determinación de la identidad de secuencia, se debería aplicar lo siguiente: Cuando las secuencias que se comparan no tienen la misma longitud, el grado de identidad se refiere al porcentaje de restos de aminoácido en la secuencia más corta que son idénticos a los restos de aminoácido en la secuencia más larga o al porcentaje de restos de aminoácido de la secuencia más larga que son idénticos a los restos de aminoácido de la secuencia más corta. Preferentemente, se refiere al porcentaje de restos de aminoácido de la secuencia más corta que son idénticos a los restos de aminoácido de la secuencia más larga. El grado de identidad de secuencia se puede determinar de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica utilizando preferentemente algoritmos de computadora adecuados tales como CLUSTAL.

10 Cuando se utiliza en procedimiento de análisis Clustal para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, al menos un 60 % idéntica a una secuencia de referencia se pueden utilizar los ajustes por defecto o los ajustes son preferentemente los siguientes: Matriz: blosum 30; Penalización de hueco abierta: 10,0; Penalización de hueco extendida: 0,05; Retraso divergente: 40; Distancia de separación de huecos: 8 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos. Para las comparaciones de secuencias de nucleótidos, la penalización de hueco extendida se fija preferentemente en 5,0.

15 En una realización preferida se utiliza ClustalW2 para la comparación de secuencias de aminoácidos. En el caso de comparaciones/alineamientos por pares, se escogen preferentemente los siguientes ajustes: Matriz de peso proteico: BLOSUM 62; hueco abierto: 10; extensión de hueco: 0,1. En el caso de comparaciones/alineamientos múltiples, se escogen preferentemente los siguientes ajustes: Matriz de peso proteico: BLOSUM 62; hueco abierto: 10; extensión de hueco: 0,2; distancia de hueco: 5; sin hueco final.

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

25 Los restos de aminoácido localizados en la posición correspondiente a una posición como se indica posteriormente en el presente documento en la secuencia de aminoácidos que se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NO: 9 y 10 pueden ser identificados por el experto mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, dichos restos de aminoácido se pueden identificar mediante alineación de la secuencia en cuestión con la secuencia que se muestra en una cualquiera de SEQ ID NO: 9 y 10 e identificando las posiciones que se corresponden con las posiciones indicadas anteriormente de una cualquiera de las SEQ ID NO: 9 y 10. El alineamiento se puede hacer con medios y procedimientos conocidos por el experto, por ejemplo, utilizando un algoritmo de computadora conocido tal como el procedimiento de Lipman-Pearson (Science 227 (1985), 1435) o el algoritmo CLUSTAL. Se prefiere que se asigne dicha homología de alineamiento máxima para los restos de aminoácido conservados presentes en las secuencias de aminoácidos.

30 En una realización preferida se utiliza ClustalW2 para la comparación de secuencias de aminoácidos. En el caso de comparaciones/alineamientos por pares, se escogen preferentemente los siguientes ajustes: Matriz de peso proteico: BLOSUM 62; hueco abierto: 10; extensión de hueco: 0,1. En el caso de comparaciones/alineamientos múltiples, se escogen preferentemente los siguientes ajustes: Matriz de peso proteico: BLOSUM 62; hueco abierto: 10; extensión de hueco: 0,2; distancia de hueco: 5; sin hueco final.

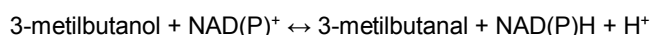
40 Conversión enzimática de 3-metilbutiraldehído en alcohol isoamílico (etapa 7 en la Figura 2)

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico, en el que la conversión enzimática de dicho 3-metilbutiraldehído en dicho alcohol isoamílico de acuerdo con (ii) anteriormente (etapa 7 en la Figura 2) se consigue utilizando el uso de una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.-. Estas enzimas son oxidoreductasas que catalizan la oxidación del grupo CH-OH de donantes con NAD⁺ o NADP⁺ como receptor y que también son capaces de catalizar la reacción inversa, es decir, la reducción de un grupo aldehído o ceto (-CH=O, C=O) utilizando NADH o NADPH como cofactor. En el contexto de la presente invención en la conversión enzimática de 3-metilbutiraldehído en alcohol isoamílico se utiliza la actividad reductasa de dicha enzima. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con NADH o NADPH como donante.

50 En esta reacción, el grupo carbonilo del 3-metilbutiraldehído se reduce en su alcohol correspondiente, es decir, el alcohol isoamílico (también denominado 3-metilbutanol o isopentanol) utilizando una oxidoreductasa (actividad reductasa) que actúa sobre el grupo carbonilo del 3-metilbutiraldehído con NADH o NADPH como donante de hidruro (EC 1.1.1.-). La conversión enzimática de 3-metilbutiraldehído en alcohol isoamílico ya se había descrito en Appl. Environ. Microbiol. 74 (2008), 5769-5775 que se producía naturalmente por una metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265). La reacción se ilustra esquemáticamente en la **Figura 5**.

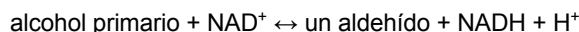
Por lo tanto, en una realización preferida, la conversión enzimática de dicho 3-metilbutiraldehído en dicho alcohol isoamílico se consigue mediante el uso de una metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265). En otras realizaciones preferidas, la conversión enzimática de dicho 3-metilbutiraldehído en dicho alcohol isoamílico se consigue mediante el uso de una alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) o una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2).

60 Las metilbutanal reductasas (EC 1.1.1.265) catalizan naturalmente la siguiente reacción



Se ha descrito que esta enzima existe en varios organismos, en particular en eucariotas. En una realización preferida la enzima es de un hongo, más preferentemente de una levadura. En una realización preferida adicional, la enzima es de género *Candida* o *Saccharomyces*. En una realización más preferida, la enzima es de un hongo de la especie *Candida boidinii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* o *Saccharomyces ludwigii*.

5 Las alcohol deshidrogenasas (EC 1.1.1.1) catalizan naturalmente la siguiente reacción



Se ha descrito que esta enzima existe en varios organismos, en particular en bacterias y eucariotas. En una realización preferida, la enzima es de una bacteria preferentemente de una bacteria del género *Aeropyrum*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Geobacillus*, *Haloferax*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Pyrococcus*, *Rhodococcus*, *Sulfolobus*, *Thermoanaerobacter*, *Thermoplasma*, *Thermus* o *Zymomonas*, más preferentemente de una bacteria de la especie *Aeropyrum pernix* (Número de acceso de UniProt Q9Y9P9), *Brevibacterium* sp., *Corynebacterium glutamicum*, *Flavobacterium frigidimaris* (Número de acceso de SwissProt Q8L3C9), *Geobacillus stearothermophilus* (Número de acceso de UniProt P42328), *Haloferax volcanii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* (Número de acceso de UniProt Q76HN6), *Pyrococcus furiosus* (SwissProt Q8U259), *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus ruber*, *Sulfolobus acidocaldarius* (Número de acceso de UniProt Q4J9F2), *Sulfolobus solfataricus* (UniProt Número de acceso de P39462), *Thermoanaerobacter brockii*, *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Número de acceso de UniProt Q0PH30), *Thermoplasma acidophilus* (Número de acceso de UniProt Q9HIM3), *Thermus* sp. (Número de acceso de UniProt B2ZRE3) o *Zymomonas mobilis*. En otra realización la enzima es de una eucariota. En una realización preferida, la enzima es del género *Bombyx*, *Drosophila*, *Gallus*, *Homo*, *Mus* o *Rattus*, más preferentemente de las especies *Bombyx mori*, *Drosophila funebris*, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila virilis*, *Drosophila simulans*, *Gallus gallus*, *Homo sapiens* (Número de acceso de UniProt P00326 o P08319), *Mus musculus* (Número de acceso de UniProt Q9QYY9) o *Rattus norvegicus*. En otra realización, la enzima es de una levadura preferentemente de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, más preferentemente de las especies *Saccharomyces carlsbergensis* (Número de acceso de UniProt B6UQD0), *Saccharomyces cerevisiae* (Número de acceso de UniProt P00331) o *Schizosaccharomyces pombe* (Número de acceso de SwissProt Q09669). En otra realización, la enzima es de un hongo, preferentemente de *Candida* o *Neurospora*, más preferentemente de las especies *Candida maris*, *Candida parapsilosis* (Número de acceso de UniProt B2KJ46) o *Neurospora grassa* (Número de acceso de SwissProt Q9P6C8). En otra realización la enzima es de una planta o un alga, preferentemente del género *Chlamydomonas*, *Glycine*, *Oryza*, *Vica* o *Zea* más preferentemente de las especies *Chlamydomonas moewusii*, *Glycine max* (Número de acceso de UniProt D4GSN2), *Oryza sativa*, *Vica faba* o *Zea mays*. En otra realización, la enzima es de un organismo del género *Entamoeba*, más preferentemente de la especie *Entamoeba histolytica*.

Las alcohol deshidrogenasas dependientes de NADP (EC 1.1.1.2) catalizan naturalmente la siguiente reacción



Se ha descrito que esta enzima existe en varios organismos, en particular en bacterias y eucariotas. En una realización preferida, la enzima es de una bacteria, preferentemente de una bacteria del género *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Geobacillus*, *Haloferax*, *Heliobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Methanobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Pyrobaculum*, *Pyrococcus*, *Thermoanaerobacter* o *Thermococcus* más preferentemente de una bacteria de la especie *Acetobacter acetii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus methanolicus*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus brevis*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium thermocellum*, *Escherichia coli*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Haloferax volcanii*, *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefirii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Methanobacterium palustre*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pyrobaculum aerophilum* (Número de acceso de UniProt Q8ZUP0), *Pyrococcus furiosus* (Número de acceso de UniProt O73949), *Thermoanaerobacter brockii*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus sibiricus* (SwissProt C6A190) o *Thermococcus* sp. (Número de acceso de UniProt C1IWT4). En una realización particularmente preferida, la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2) es la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP del *Mycobacterium smegmatis* (Número de acceso de UniProt P0CH36). En otra realización la enzima es de una eucariota. En una realización preferida, la enzima es del género *Bos*, *Drosophila*, *Felis*, *Homo*, *Mus*, *Rattus* o *Sus*, más preferentemente de la especie *Bos taurus*, *Drosophila melanogaster*, *Felis* sp., *Homo sapiens* (Número de acceso de UniProt P14550), *Mus musculus* (Número de acceso de SwissProt Q9JII6), *Rattus norvegicus* o *Sus scrofa* (Número de acceso de UniProt P50578). En otra realización, la enzima es de un hongo, preferentemente de un hongo del género *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, más preferentemente de la especie *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces lactis* (Número de acceso de UniProt P49384), *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*. En otra realización, la enzima es de un organismo del género *Entamoeba*, más preferentemente de la especie *Entamoeba histolytica*.

60 Conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico (etapa 8 en la Figura 2)

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico (3-metilbutan-1-ol) que comprende la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico en el que, en una posibilidad alternativa a la anterior, la 3-metilbutiril-CoA se convierte directamente en alcohol isoamílico. Por lo tanto, de manera similar a la conversión descrita anteriormente de la 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico que progresa mediante el 3-metilbutiraldehído, en una posibilidad alternativa, esta reacción en dos etapas se cataliza por una enzima que cataliza ambas etapas de reducción. Una enzima que se puede emplear en esta conversión es una acil de cadena corta-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa que también se denomina acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa (EC 1.2.1.84). En el Ejemplo 2 se han ensayado distintas enzimas individuales de diferentes organismos con respecto a su capacidad para convertir directamente la 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico y en el Ejemplo 2 estas enzimas se abrevian colectivamente con la expresión "SDR reductasa".

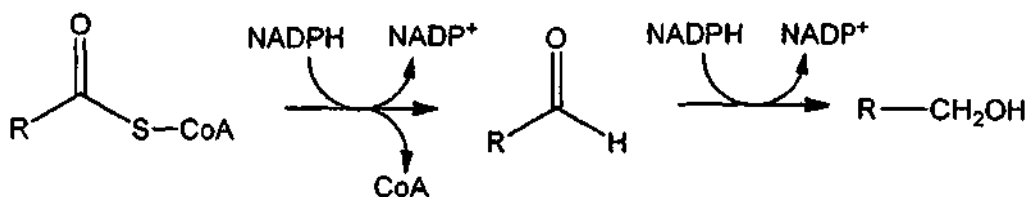
Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico (3-metilbutan-1-ol) que comprende la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico, que comprende: (b) una única reacción enzimática en la que la 3-metilbutiril-CoA se convierte directamente en alcohol isoamílico utilizando una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/ acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) (etapa 8 en la Figura 2).

Por lo tanto, las dos reducciones que se ilustran en la **Figura 6**, es decir, la conversión enzimática de la 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico (3-metilbutan-1-ol) mediante 3-metilbutiraldehído, se catalizan por una única enzima. En una realización preferida, la conversión directa de la 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico se puede conseguir utilizando una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA.

La acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasas que se pueden emplear para catalizar la conversión de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico (3-metilbutan-1-ol) mediante 3-metilbutiraldehído, a la que también se hace referencia como "deshidrogenasa de cadena corta/acil graso-CoA reductasa" o "deshidrogenasa" de cadena corta/reductasas (SDR)", en el contexto de la presente invención se refiere a enzimas que se caracterizan por las características de que catalizan una reacción en dos etapas en las que la acil graso-CoA se reduce a un alcohol graso y porque muestran una especificidad de sustrato por la acil-CoA que contiene cadenas de carbono alifáticas.

Las enzimas deshidrogenasa de cadena corta/acil graso-CoA reductasa o deshidrogenasas de cadena corta/reductasas (SDR) constituyen una familia de enzimas, de las que se sabe que la mayoría de las cuales son oxidoreductasas dependientes de NAD o NADP (Jornvall H. y col., *Biochemistry* 34 (1995), 6003-6013). Recientemente, se ha caracterizado una nueva reductasa bacteriana dependiente de NADP de *Marinobacter aquaeolei* VT8 (Willis y col., *Biochemistry* 50 (2011), 10550-10558). Esta enzima cataliza la reducción de cuatro electrones de los sustratos de acil graso-CoA a los correspondientes alcoholes grasos.

La conversión enzimática de acil graso-CoA en alcohol graso se produce mediante un intermediario aldehído de acuerdo con el siguiente esquema:



La enzima presenta actividad sobre los sustratos de acil graso-CoA (tanto saturada como insaturada) así como sobre los sustratos de aldehídos grasos. De manera característica, las proteínas de esta familia poseen dos motivos de unión a NAD(P)(H), que tienen la secuencia conservada GXGX(1-2X)G (Willis y col., *Biochemistry* 50 (2011), 10550-10558; Jörnvall H. y col., *Biochemistry* 34 (1995), 6003-6013). El primer patrón, GTGFIG, se identifica cerca del extremo N y la segunda secuencia de firma, GXXXGXG, se localiza entre los restos 384-390.

En principio cualquier "deshidrogenasa de cadena corta / acil graso-CoA reductasa" o "deshidrogenasas de cadena corta/reductasas (SDR)" se puede aplicar en el procedimiento de acuerdo con la invención.

Preferentemente, la deshidrogenasa de cadena corta/acil graso-CoA deshidrogenasa es una deshidrogenasa de cadena corta /acil graso-CoA reductasa de una bacteria marina, preferentemente del género *Marinobacter* o *Hahella*, más preferentemente de la especie *Marinobacter aquaeolei*, más preferentemente *Marinobacter aquaeolei* VT8, *Marinobacter manganoxydans*, *Marinobacter algicola*, *Marinobacter* sp. ELB17 o *Hahella chejuensis*. Ejemplos de dichas enzimas son la deshidrogenasa de cadena corta/acil graso-CoA reductasa de *Marinobacter aquaeolei* VT8 (Número de acceso de Uniprot A1U3L3; Willis y col., *Biochemistry* 50 (2011), 10550-10558), la deshidrogenasa de cadena corta de *Marinobacter manganoxydans* (Número de acceso de Uniprot G6YQS9), la deshidrogenasa de cadena corta de *Marinobacter algicola* (Número de acceso de Uniprot A6EUH6), la deshidrogenasa de cadena corta de *Marinobacter* sp. ELB17 (Número de acceso de Uniprot A3JCC5), la deshidrogenasa de cadena corta de *Hahella chejuensis* (Número de acceso de Uniprot Q2SCE0) y la deshidrogenasa de cadena corta/ reductasa de *Marinobacter*

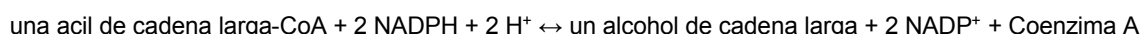
hydrocarbonoclasticus ATCC 49840 (Número de acceso de Uniprot H8W980).

La secuencia de la deshidrogenasa de cadena corta/acil graso-CoA reductasa de *Marinobacter aquaeolei* VT8 (también denominada *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (cepa ATCC 700491 / DSM 11845 / VT8)) se muestra en la SEQ ID NO: 1. La secuencia de la deshidrogenasa de cadena corta/acil graso-CoA reductasa de *Marinobacter manganoxydans* (también denominado *Marinobacter manganoxydans* Mnl7-9) se muestra en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de la deshidrogenasa de cadena corta/acil graso-CoA reductasa de *Marinobacter sp.* ELB17 se muestra en la SEQ ID NO: 3. La secuencia de la deshidrogenasa de cadena corta/acil graso-CoA reductasa de *Marinobacter algicola* (también denominada *Marinobacter algicola* DG893) se muestra en la SEQ ID NO: 4. La secuencia de la deshidrogenasa de cadena corta/acil graso-CoA reductasa de *Hahella chejuensis* (también denominada *Hahella chejuensis* (cepa KCTC 2396)) se muestra en la SEQ ID NO: 11. La secuencia de la deshidrogenasa de cadena corta/reductasa de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840 (Número de acceso de Uniprot H8W980) se muestra en la SEQ ID NO: 13. En una realización particularmente preferida se puede emplear cualquier proteína que presente una secuencia de aminoácidos como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 4, 11 y 13 o que presente una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 80 % homóloga a la SEQ ID NO: 1 a 4, 11 y 13 y que tenga la actividad de una deshidrogenasa de cadena corta/acil graso-CoA reductasa en la que dicha enzima es capaz de catalizar la conversión enzimática de la 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutanol mediante 3-metilbutiraldehído, en un procedimiento de acuerdo con la presente invención. En una realización preferida dicha enzima tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 4, 11 y 13 o que presente una secuencia de aminoácidos que sea al menos un x % homóloga respecto a cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 4, 11 y 13 y tenga la actividad de una deshidrogenasa de cadena corta/acil graso-CoA reductasa siendo x un número entero entre 30 y 100, preferentemente 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 en el que dicha enzima es capaz de la conversión de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutanol mediante 3-metilbutiraldehído como se ha expuesto anteriormente en el presente documento.

Con respecto a la determinación de la identidad de secuencia, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente. En otra realización preferida, la conversión de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico se cataliza utilizando una deshidrogenasa de cadena corta/reductasa de una bacteria marina fotoheterotrófica que pertenece al género *Erythrobacter* y utilizando NADH o NADPH como cofactores, preferentemente utilizando una deshidrogenasa de cadena corta /reductasa de la bacteria marina fotoheterotrófica *Erythrobacter sp.* NAP1 (Número de acceso de Uniprot: A3WE13). En otra realización preferida, la conversión de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico se cataliza utilizando una deshidrogenasa de cadena corta/reductasa de una bacteria del género *Chloroflexus*, preferentemente utilizando una deshidrogenasa de cadena corta /reductasa de *Chloroflexus aggregans* cepa MD-66/ DSM 9485 (Número de acceso de Uniprot B8G7Y5).

En una realización preferida, la conversión directa de la 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico se puede conseguir utilizando una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84).

Las acil formador de alcohol-CoA reductasas (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) catalizan naturalmente la siguiente reacción:



Esta enzima existe en una variedad de organismos, en particular en eucariotas. En una realización preferida, la enzima es de una planta, preferentemente de una planta del género *Arabidopsis* o *Simmondsia*, más preferentemente de la especie *Arabidopsis thaliana* (Número de acceso de UniProt Q93ZB9, Q0WRB0, Q39152, o Q9LXN3) o de la especie *Simmondsia chinensis* (Número de acceso de UniProt Q9XGY7). En otra realización preferida, la enzima es de un animal, más preferentemente de un mamífero, incluso más preferentemente de un roedor, particularmente de un roedor del género *Cavia* o *Mus*. Se prefieren las especies *Cavia porcellus* y *Mus musculus* (Número de acceso de SwissProt Q7TNT2 o Q922J9).

Conversión enzimática de alcohol isoamílico en acetato de isoamilo (etapa 9 en la Figura 2)

Como se ha mencionado anteriormente, el alcohol isoamílico que se produce de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento se puede convertir adicionalmente en acetato de isoamilo (al que también se hace referencia como acetato de 3-metilbutilo) mediante una reacción enzimática, a saber, la conversión enzimática de alcohol isoamílico en acetato de isoamilo. La conversión enzimática de alcohol isoamílico en acetato de isoamilo se ilustra esquemáticamente en la **Figura 8**.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción de acetato de isoamilo en la cual primero se convierte la 3-metil-butiril-CoA en alcohol isoamílico como se ha descrito anteriormente en el presente documento en el que dicho alcohol isoamílico se convierte luego enzimáticamente de manera adicional en acetato de isoamilo.

En una realización preferida, la conversión enzimática del alcohol isoamílico en acetato de isoamilo se puede conseguir utilizando cualquier alcohol-O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.84).

Las alcohol-O-acetiltransferasas (EC 2.3.1.84) son enzimas que catalizan naturalmente la siguiente reacción:



Esta enzima se encuentra en una variedad de organismos, incluyendo organismos procariontes y eucariotes tales como plantas y levaduras.

5 En una realización preferida, la enzima es de un hongo, más preferentemente de una levadura. Preferentemente, la enzima es de un organismo del género *Cyberlindnera*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Wickerhamomyces* o *Saccharomyces*, más preferentemente de las especies *Cyberlindnera mrakii*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Kluyveromyces lactis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces uvarum* o *Saccharomyces cerevisiae* (Número de acceso de UniProt Q6XBT0).

10 La condensación enzimática del alcohol isoamílico exógeno (3-metilbutan-1-ol) y la acetil-CoA endógena en acetato de isoamilo (acetato de 3-metilbutilo) en una *Escherichia coli* modificada utilizando una alcohol-O-acetiltransferasa de *S. cerevisiae* ya se había descrito (Appl. Microbiol. Biotechnol. 63 (2004), 698-704).

15 Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, la conversión enzimática de alcohol isoamílico en acetato de isoamilo se consigue preferentemente mediante una alcohol-O-acetiltransferasa de *S. cerevisiae*. En una realización particularmente preferida, la enzima es una alcohol-O-acetiltransferasa de *S. cerevisiae* que está codificada por el gen ATF2 (Número de acceso de UniProt Q6XBT0). En otra realización particularmente preferida, la alcohol-O-acetiltransferasa codificada por el gen ATF2 es de otro genotipo de *S. cerevisiae* que tiene el Número de acceso de UniProt P53296).

20 En una realización preferida la enzima es una enzima de una planta, preferentemente del género *Cucumis*, *Cymbopogon*, *Fragaria*, *Petunia*, *Rosa*, *Solanum*, *Malus*, *Vasconcellea* o *Musa*, más preferentemente de las especies *Cucumis melo*, *Cymbopogon martini*, *Fragaria ananassa* (Número de acceso de UniProt G1EFQ3), *Petunia hybrida* (Número de acceso de UniProt A1 XWY7), *Rosa hybrida* cultivar (Número de acceso de UniProt Q516B5), *Solanum lycopersicum*, *Vasconcellea cundinamarcensis* (Número de acceso de UniProt D0QJ94), *Musa acuminata*, *Musa paradisical* o *Malus domestica*.

25 **Conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA (etapa 5 en la Figura 2)**

La 3-metilbutiril-CoA que se convierte de acuerdo con la presente invención en alcohol isoamílico de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente (y convertido adicionalmente en acetato de isoamilo de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente) se pueden proporcionarse por sí mismos mediante una reacción enzimática, a saber, la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA (a la que también se hace referencia como 3-metilbut-2-enoil-CoA) en 3-metilbutiril-CoA. La conversión de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA se ilustra esquemáticamente en la **Figura 7**.

30 Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico (o acetato de isoamilo) a partir de 3-metilcrotonil-CoA en la que la 3-metilbutiril-CoA se proporciona primero mediante la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en dicha 3-metilbutiril-CoA. Adicionalmente, la 3-metilbutiril-CoA se convierte adicionalmente entonces en alcohol isoamílico (o adicionalmente a acetato de isoamilo) como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

La conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA, es decir, la reducción del doble enlace de la 3-metilcrotonil-CoA, puede conseguirse, por ejemplo, empleando una enzima clasificada como EC 1.3.1.1. Las enzimas clasificadas como EC 1.3.1.1 son oxidorreductasas que actúan sobre un grupo CH-CH. Las sub-subclases de EC 1.3.1.1 se clasifican dependiendo del receptor. En una realización preferida particular, la enzima es una enzima que utiliza NAD⁺ o NADP⁺ como co-sustrato y que pertenece a la sub-subclase EC 1.3.1.1.

40 Se conocen muchas oxidorreductasas del subgrupo EC 1.3.1.1 que actúan sobre los dobles enlaces carbono-carbono en la posición α , β en relación con el grupo carbonilo. Muchas de estas enzimas catalizan la reducción de cetonas α , β insaturadas o ésteres de CoA. Por lo tanto, en una realización preferida de acuerdo con la presente invención, la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en dicha 3-metilbutiril-CoA se consigue utilizando una enzima que se clasifica como EC 1.3.1.1 y que es una oxidorreductasa que actúa sobre los enlaces dobles C=C de la 3-metilcrotonil-CoA con NADH o NADPH como donantes de hidruro.

50 En una realización particularmente preferida la enzima es una enzima que utiliza el NADPH como cofactor. La conversión que utiliza dicha enzima se muestra esquemáticamente en la Figura 1. En una realización preferida, la enzima se selecciona de entre el grupo que consiste en:

- una acil-CoA deshidrogenasa (NADP⁺) (EC 1.3.1.8);
- una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.10);
- una cis-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.37);
- una trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.38);
- 55 - una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.39); y
- una crotonil-CoA reductasa (EC 1.3.1.86).

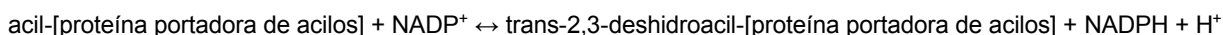
Por lo tanto, en una realización preferida la conversión de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA se consigue

utilizando una acil-CoA deshidrogenasa (NADP⁺) (EC 1.3.1.8). Las acil-CoA deshidrogenasas son enzimas que catalizan la siguiente reacción:



5 Esta enzima se encuentra en una variedad de organismos, incluyendo organismos procariotas y eucariotas tales como plantas, animales, hongos y bacterias. La enzima se ha descrito, por ejemplo, en *Bos taurus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Columba sp.*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, *Allium ampeloprasum*, *Euglena gracilis*, *Candida albicans*, *Streptococcus collinus*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Mycobacterium smegmatis*.

10 En una realización preferida adicional, la conversión de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA se consigue utilizando una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.10). Las enoil-[proteína portadora de acilos] reductasas (NADPH, específica de Si) son enzimas que catalizan la siguiente reacción:



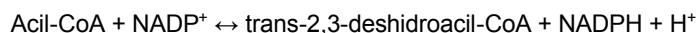
15 Esta enzima se encuentra en una variedad de organismos, incluyendo organismos procariotas y eucariotas tales como plantas, hongos y bacterias. La enzima se ha descrito, por ejemplo, en *Carthamus tinctorius*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptococcus collinus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*.

En una realización preferida adicional, la conversión de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA se consigue utilizando una cis-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.37). Las cis-2-enoil-CoA reductasas (NADPH) son enzimas que catalizan la siguiente reacción:



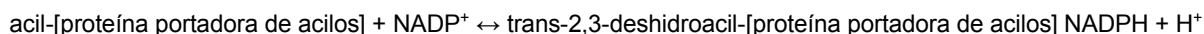
20 Se ha descrito que esta enzima se encuentra en *Escherichia coli*.

En una realización preferida adicional, la conversión de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA se consigue utilizando una trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.38). Las trans-2-enoil-CoA reductasas (NADPH) son enzimas que catalizan la siguiente reacción:



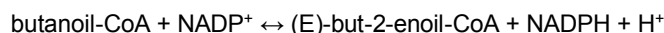
25 Esta enzima se encuentra en una variedad de organismos, incluyendo organismos procariotas y eucariotas tales como plantas, animales y bacterias. La enzima se ha descrito, por ejemplo, en *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Cavia porcellus*, *Caenorhabditis elegans*, *Phalaenopsis amabilis*, *Gossypium hirsutum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus collinu* y *Escherichia coli*.

30 En una realización preferida adicional, la conversión de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA se consigue utilizando una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Re) (EC 1.3.1.39). Las enoil-[proteína portadora de acilos] reductasas (NADPH, específica de Re) son enzimas que catalizan la siguiente reacción:



35 Esta enzima se encuentra en una variedad de organismos, incluyendo organismos procariotas y eucariotas tales como animales y bacterias. La enzima se ha descrito, por ejemplo, en *Gallus gallus*, *Paloma*, *Rattus norvegicus*, *Cavia porcellus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Porphyromonas gingivalis*.

En una realización preferida adicional, la conversión de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA se consigue utilizando una crotonil-CoA reductasa (EC 1.3.1.86). Las crotonil-CoA reductasas son enzimas que catalizan la siguiente reacción:

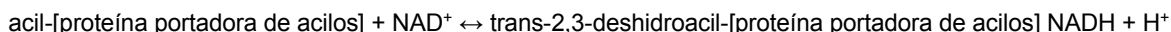


40 Esta enzima se encuentra en una variedad de organismos, incluyendo organismos procariotas y eucariotas tales como animales, hongos y bacterias. La enzima se ha descrito, por ejemplo, en *Bos taurus*, *Salinospora tropica*, *Clostridium difficile*, *Streptomyces collinus*, *Streptomyces cinnamomensis* y *Streptomyces hygroscopicus*.

45 En otra realización particularmente preferida, la enzima es una enzima que utiliza el NADH como cofactor. La conversión que utiliza dicha enzima se muestra esquemáticamente en la Figura 2. En una realización preferida, la enzima se selecciona de entre el grupo que consiste en:

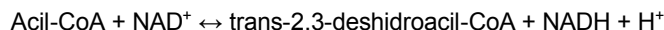
- una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADH) (EC 1.3.1.9); y
- una trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD⁺) (EC 1.3.1.44).

50 Por lo tanto, en una realización preferida la conversión de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA se consigue utilizando una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADH) (EC 1.3.1.9). Las enoil-[proteína portadora de acilos] reductasas (NADH) son enzimas que catalizan la siguiente reacción:



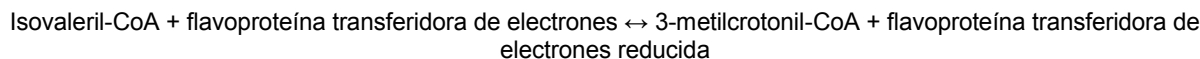
Esta enzima se encuentra en una variedad de organismos, incluyendo organismos procariotas y eucariotas tales como plantas y bacterias. La enzima se ha descrito, por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana*, *Plasmodium falciparum*, *Eimeria tenella*, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, *Birkholderia mallei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia pestis* y muchos otros.

En una realización preferida adicional, la conversión de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA se consigue utilizando una trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD⁺) (EC 1.3.1.44). Las trans-2-enoil-CoA reductasas (NAD⁺) son enzimas que catalizan la siguiente reacción:



Esta enzima se encuentra en una variedad de organismos, incluyendo organismos procariotas y eucariotas tales como plantas, animales y bacterias. La enzima se ha descrito, por ejemplo, en *Rattus norvegicus*, *Euglena gracilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Clostridium acetobutylicum*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Treponema denticola*.

En otra realización preferida la enzima es una enzima que se clasifica como EC 1.3.8 y que utiliza un grupo prostético de flavina como receptor. La conversión que utiliza dicha enzima se muestra esquemáticamente en la Figura 3. En una realización preferida la enzima es una isovaleril-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.8.4). Las isovaleril-CoA deshidrogenasas son enzimas que catalizan la siguiente reacción:



Esta enzima se encuentra en una variedad de organismos, incluyendo organismos procariotas y eucariotas tales como plantas, animales, hongos y bacterias. La enzima se ha descrito, por ejemplo, en *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Cavia porcellus*, *Bombyx mori*, *Caenorhabditis elegans*, *Solanum tuberosum*, *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum*, *Aspergillus oryzae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Halobacterium salinarum*.

En otra realización, la conversión de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA puede conseguirse, por ejemplo, utilizando la enzima de *Myxococcus* sp. que está codificada por el gen *liuA* (Li y col., *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013), 1304-1308). Esta enzima (*AibC*, *LiuA*) se anotó como una oxidoreductasa y como perteneciente a la familia de las deshidrogenasas de unión al zinc. Se demostró que la enzima reducía la 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA utilizando NADH como cofactor. La secuencia de dicha proteína está disponible bajo el Número de acceso de Uniprot Q1D4I2.

En una realización preferida dicha enzima tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5 o presenta una secuencia de aminoácidos que es al menos un x % homóloga a la SEQ ID NO: 5 y tiene la actividad de una oxidoreductasa siendo x un número entero entre 30 y 100, preferentemente 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 en el que dicha enzima es capaz de la conversión de 3-metilcrotonil-CoA en dicho 3-metilbutiril-CoA como se ha expuesto anteriormente en el presente documento.

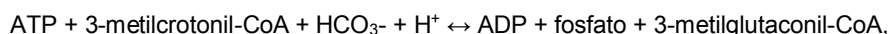
Con respecto a la determinación de la identidad de secuencia, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente.

Conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA (etapa 4 en la Figura 2)

La 3-metilcrotonil-CoA que se convierte de acuerdo con la presente invención en 3-metilbutiril-CoA de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente (y convertida adicionalmente en alcohol isoamílico de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente que se convierte adicionalmente en acetato de isoamilo de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente) se pueden proporcionarse por sí mismos mediante una reacción enzimática, a saber, la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA mediante descarboxilación en dicha 3-metilcrotonil-CoA. La conversión de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA se ilustra esquemáticamente en la **Figura 9**.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico (o acetato de isoamilo) a partir de 3-metilglutaconil-CoA en la que la 3-metilcrotonil-CoA se proporciona primero mediante la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA que después se convierte en 3-metilbutiril-CoA. Adicionalmente, la 3-metilbutiril-CoA se convierte adicionalmente entonces en alcohol isoamílico (o adicionalmente a acetato de isoamilo) como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

De acuerdo con la presente invención la conversión enzimática de la 3-metilglutaconil-CoA en dicha 3-metilcrotonil-CoA puede catalizarse mediante enzimas diferentes. En una realización preferida, la conversión enzimática de la 3-metilglutaconil-CoA en dicha 3-metilcrotonil-CoA utiliza una 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.4). Se ha descrito que las metilcrotonil-CoA carboxilasas catalizan la siguiente reacción:



es decir, la carboxilación, pero se pueden utilizar para catalizar la reacción de descarboxilación. Las metilcrotonil-CoA carboxilasas se encuentran en una variedad de organismos, incluyendo organismos procariotas y eucariotas tales como plantas, animales, hongos y bacterias. La enzima se ha descrito, por ejemplo, en *Daucus carota*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Pisum sativum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Zea mays*, *Arabidopsis sp.*, *Lens culinaris*, *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Pagrus major*, *Emericella nidulans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas citronellolis*, *Acidaminococcus fermentans*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium sp.* y *Achromobacter sp.*

En otra realización preferida la conversión enzimática de la 3-metilglutaconil-CoA mediante descarboxilación en 3-metilcrotonil-CoA es catalizada por una geranoil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.5). Las geranoil-CoA carboxilasas catalizan naturalmente la siguiente reacción:

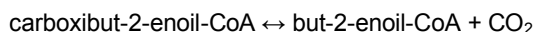


Las enzimas se encuentran en eucariotas y procariotas, tales como plantas y bacterias. La enzima se ha descrito, por ejemplo, en *Daucus carota*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas citronellolis* y *Pseudomonas mendocina*.

En otra realización preferida, la conversión de 3-metilglutaconil-CoA mediante descarboxilación en 3-metilcrotonil-CoA es catalizada por una 3-metilglutaconil-CoA descarboxilasa, por ejemplo, una 3-metilglutaconil-CoA descarboxilasa de *Myxococcus xanthus* codificada por el gen *liuB* (Números de acceso de UniProt Q1D4I4 y Q1D4I3). Este gen codifica una enzima que tiene dos subunidades AibA y AibB (Li y col., *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013), 1304-1308).

En otra realización preferida la conversión enzimática de la 3-metilglutaconil-CoA mediante descarboxilación en 3-metilcrotonil-CoA es catalizada por una glutaconil-CoA descarboxilasa (EC 4.1.1.70). Esta enzima cataliza naturalmente la descarboxilación de glutaconil-CoA en 2-butenoil-CoA a la que también se hace referencia como crotonil-CoA.

Por lo tanto, las glutaconil-CoA descarboxilasas (EC 4.1.1.70) catalizan naturalmente la siguiente reacción:



Esta enzima se encuentra en una variedad de organismos, en particular en bacterias, y se ha descrito, por ejemplo, en *Acidaminococcus fermentans* (Número de acceso de UniProt Q06700), *Clostridium symbiosum* (Número de acceso de UniProt B7TVP1), *Clostridium tetanomorphum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptoniphilus asaccharolyticus*, *Pseudomonas sp.* y *Syntrophus gentianae*.

Conversión enzimática de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en 3-metilglutaconil-CoA (etapa 3 en la Figura 2)

La 3-metilglutaconil-CoA que se convierte de acuerdo con la presente invención en 3-metilcrotonil-CoA de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente (y que se convierte adicionalmente de acuerdo con la presente invención en 3-metilbutiril-CoA de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente y se convierte adicionalmente en alcohol isoamílico de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente que se convierte adicionalmente en acetato de isoamilo de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente) se puede proporcionar por sí mismo mediante una reacción enzimática, a saber, la conversión enzimática de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en dicha 3-metilglutaconil-CoA mediante deshidratación. La conversión de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en dicha 3-metilglutaconil-CoA se ilustra esquemáticamente en la **Figura 10**.

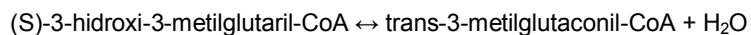
Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico (o acetato de isoamilo) a partir de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en la que la 3-metilglutaconil-CoA se proporciona primero mediante la conversión enzimática de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en 3-metilglutaconil-CoA que después se convierte en 3-metilcrotonil-CoA. Adicionalmente, la 3-metilcrotonil-CoA se convierte entonces adicionalmente en 3-metilbutiril-CoA. Adicionalmente, la 3-metilbutiril-CoA se convierte adicionalmente entonces en alcohol isoamílico (o adicionalmente a acetato de isoamilo) como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

De acuerdo con la presente invención, la conversión de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en 3-metilglutaconil-CoA utiliza preferentemente una enzima que cataliza la deshidratación de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. El término "deshidratación" se refiere en general a una reacción que implica la retirada de H₂O. Las enzimas que catalizan la deshidratación de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA son enzimas que catalizan la reacción que se muestra en la **Figura 10**.

Esta reacción se cataliza naturalmente por la enzima 3-metilglutaconil-coenzima A hidratasa (EC 4.2.1.18) y se muestra en la **Figura 10**.

Por lo tanto, en una realización preferida, la conversión enzimática de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en 3-metilglutaconil-CoA utiliza una 3-metilglutaconil-coenzima A hidratasa (EC 4.2.1.18).

Las 3-metilglutaconil-coenzima A hidratasas son enzimas que catalizan la siguiente reacción:



Esta enzima se encuentra en una variedad de organismos, incluyendo organismos procariotas y eucariotas tales como plantas, animales y bacterias. La enzima se ha descrito, por ejemplo, en *Catharantus roseus*, *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Acinetobacter* sp., *Myxococcus* sp. y *Pseudomonas putida*. En una realización preferida, la conversión enzimática de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en 3-metilglutaconil-CoA utiliza una 3-metilglutaconil-coenzima A hidratasa de *Myxococcus* sp. (Número de acceso de UniProt U2TLJ6). En una realización preferida la 3-metilglutaconil-coenzima A hidratasa en una enzima de *Myxococcus* sp., e incluso más preferentemente una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 6 o presenta una secuencia de aminoácidos que es al menos un x % homóloga a la SEQ ID NO: 6 y tiene la actividad de una 3-metilglutaconil-coenzima A hidratasa siendo x un número entero entre 30 y 100, preferentemente 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 en el que dicha enzima es capaz de la conversión de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en 3-metilglutaconil-CoA como se ha expuesto anteriormente en el presente documento. Con respecto a la determinación del grado de identidad, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente.

La conversión de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en 3-metilglutaconil-CoA también se puede conseguir utilizando una actividad 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A deshidratasa que se ha identificado en *Myxococcus xanthus* que es codificada por el gen liuC (Número de acceso de UniProt Q1D5Y4) (Li y col., *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013), 1304-1308).

La conversión de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en 3-metilglutaconil-CoA también se puede conseguir utilizando una actividad 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A deshidratasa anterior que se ha identificado en *Myxococcus xanthus* y que pertenece a enzimas clasificadas como 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA deshidratasa (EC 4.2.1.55). Más bien, de acuerdo con la presente invención, la conversión de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en 3-metilglutaconil-CoA utiliza preferentemente una 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA deshidratasa (EC 4.2.1.55).

Las 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA deshidratasa (EC 4.2.1.55) son enzimas que catalizan naturalmente la siguiente reacción:



Esta enzima se encuentra en una variedad de organismos, incluyendo organismos procariotas y eucariotas y se ha descrito en *Rattus norvegicus* y *Rhodospirillum rubrum*.

En una realización preferida la conversión de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en 3-metilglutaconil-CoA utiliza una 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA deshidratasa de una bacteria que pertenece a un género seleccionado de entre el grupo que consiste en *Myxococcus*, *Coralloccoccus* y *Stigmatella*. En una realización más preferida, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA deshidratasa es una enzima de *Myxococcus fulvus* (Número de acceso de Uniprot F8CDH2), *Myxococcus stipitatus* (Número de acceso de Uniprot L7U993), *Coralloccoccus coralloides* (Número de acceso de Uniprot H8N0F4) o *Stigmatella aurantiaca* (Número de acceso de Uniprot Q08YS1).

Condensación enzimática de acetoacil-CoA y acetil-CoA en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (etapa 2 en la Figura 2)

La 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA que se convierte de acuerdo con la presente invención en 3-metilglutaconil-CoA de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente (y que se convierte adicionalmente de acuerdo con la presente invención en 3-metilcrotonil-CoA de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente y que se convierte adicionalmente de acuerdo con la presente invención en 3-metilbutiril-CoA de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente y se convierte adicionalmente en alcohol isoamílico de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente que se convierte adicionalmente en acetato de isoamilo de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente) se puede proporcionar por sí misma mediante una reacción enzimática, a saber, la condensación enzimática de acetoacil-CoA y acetil-CoA en dicha 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. La condensación de acetoacil-CoA y acetil-CoA en dicha 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA se ilustra esquemáticamente en la **Figura 11**.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico (o acetato de isoamilo) a partir de acetoacil-CoA en el que primero se proporciona 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA mediante la condensación de acetoacil-CoA y acetil-CoA en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA que se convierte adicionalmente en 3-metilglutaconil-CoA que después se convierte adicionalmente en 3-metilcrotonil-CoA. Adicionalmente, la 3-metilcrotonil-CoA se convierte entonces adicionalmente en 3-metilbutiril-CoA. Adicionalmente, la 3-metilbutiril-CoA se convierte adicionalmente entonces en alcohol isoamílico (o adicionalmente a acetato de isoamilo) como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA que se convierte en 3-metilglutaconil-CoA puede proporcionarse por sí misma enzimáticamente, por ejemplo, mediante la condensación de acetil-CoA y acetoacil-CoA, una reacción que está catalizada naturalmente por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (a la que también se hace referencia como HMG-CoA sintasa). Las HMG-CoA sintasas se clasifican en EC 2.3.3.10 (anteriormente, la HMG-CoA sintasa se había clasificado como EC 4.1.3.5 pero se ha transferido a EC 2.3.3.10). La expresión "HMG-CoA sintasa" se refiere a cualquier enzima que sea capaz de catalizar la reacción en la

que la acetil-CoA se condensa con la acetoacetil-CoA para formar la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) (véase la **Figura 11**). La HMG-CoA sintasa es parte de la ruta del mevalonato. Se han identificado dos rutas para la síntesis del pirofosfato de isopentenilo (IPP), es decir, la ruta del mevalonato y la ruta del gliceraldehído 3-fosfato-piruvato. La HMG-CoA sintasa cataliza la condensación biológica de Claisen de la acetil-CoA con acetoacetil-CoA y es un miembro de la superfamilia de las enzimas condensadoras de acilo que incluye las beta-cetotilasas, sintasas de ácidos grasos (beta-cetoacil proteína portadora sintasa) y poliquétido sintasas.

La HMG-CoA sintasa se ha descrito en distintos organismos. También están disponibles las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico que codifican la HMG-CoA sintasas de numerosas fuentes. En general, las secuencias solo comparten un bajo grado de identidad de secuencia total. Por ejemplo, las enzimas de *Staphylococcus* o *Streptococcus* solo muestran aproximadamente un 20 % de identidad con la HMG-CoA sintasa humana y aviar. En algunas fuentes se ha publicado que las HMG-CoA sintasas bacterianas y sus equivalentes animales presentan solo aproximadamente un 10 % de identidad de secuencia total (Sutherland y col., *J. Bacteriol.* 184 (2002), 4065-4070). Sin embargo, los restos de aminoácido implicados en las reacciones de acetilación y condensación están conservadas entre las HMG-CoA sintasas bacteriana y de eucariotas (Campobasso y col., *J. Biol. Chem.* 279 (2004), 44883-44888). Se ha determinado la estructura tridimensional de tres enzimas HMG-CoA sintasas y los aminoácidos cruciales para la reacción enzimática están en principio bien caracterizados (Campobasso y col., loc. cit.; Chun y col., *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 17946-17953; Nagegowda y col., *Biochem. J.* 383 (2004), 517-527; Hegardt, *Biochem. J.* 338 (1999), 569-582). En eucariotas existen dos formas de HMG-CoA sintasa, es decir una forma citosólica y una mitocondrial. La forma citosólica tiene un papel clave en la producción de colesterol y otros isoprenoides y la forma mitocondrial está implicada en la producción de cuerpos cetónicos.

En principio, cualquier enzima HMG-CoA sintasa se puede utilizar en el contexto de la presente invención, en particular de organismos procariontas o eucariotas.

Las HMG-CoA sintasas de procariontas se han descrito, por ejemplo, en *Staphylococcus aureus* (Campobasso y col., loc. cit.; Número de acceso de Uniprot Q9FD87), *Staphylococcus epidermidis* (Número de acceso de Uniprot Q9FD76), *Staphylococcus haemolyticus* (Número de acceso de Uniprot Q9FD82), *Enterococcus faecalis* (Sutherland y col., loc. cit.; Número de acceso de Uniprot Q9FD7), *Enterococcus faecium* (Número de acceso de Uniprot Q9FD66), *Streptococcus pneumoniae* (Número de acceso de Uniprot Q9FD56), *Streptococcus pyogenes* (Número de acceso de Uniprot Q9FD61) y *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Número de acceso AE000857), *Borrelia burgdorferi* (Número de acceso de NCBI BB0683). HMG-CoA sintasas adicionales se describen, por ejemplo, en el documento WO 2011/032934.

En una realización preferida la condensación de acetil-CoA y acetoacetil-CoA en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA utiliza una HMG-CoA sintasa de una bacteria de un género seleccionado de entre el grupo que consiste en *Enterococcus*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Lactobacillus* o *Myxococcus*. En una realización más preferida, la HMG-CoA sintasa es de *Enterococcus faecalis*, incluso más preferentemente de *Enterococcus faecalis* (cepa ATCC 700802 / V583) (Número de acceso de Uniprot Q835L4), *Schizosaccharomyces pombe*, incluso más preferentemente de *Schizosaccharomyces pombe* (cepa 972/ ATCC 24843) (Número de acceso de Uniprot P54874), *Saccharomyces cerevisiae*, incluso más preferentemente de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa ATCC 204508 / S288c) (Número de acceso de Uniprot P54839), *Lactobacillus delbrueckii*, incluso más preferentemente de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* (cepa ATCC 11842) (Número de acceso de Uniprot Q1GAH5) o *Myxococcus xanthus* (Número de acceso de UniProt Q1D411).

Una HMG-CoA sintasa preferida es la enzima de *Schizosaccharomyces pombe* (Uniprot P54874). La secuencia de la HMG-CoA sintasa de *Schizosaccharomyces pombe* (Uniprot P54874) se muestra en la SEQ ID NO: 7. En una realización particularmente preferida, la HMG-CoA sintasa empleada en el procedimiento de la invención tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 7 o presenta una secuencia de aminoácidos que es al menos un x % homóloga a la SEQ ID NO: 7 y tiene la actividad de una HMG-CoA sintasa siendo x un número entero entre 30 y 100, preferentemente 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 en el que dicha enzima es capaz de la condensación de acetil-CoA y acetoacetil-CoA en dicho 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. Con respecto a la determinación del grado de identidad, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente.

Otra HMG-CoA sintasa preferida es la enzima de *Myxococcus xanthus* (Número de acceso de UniProt Q1D411). La secuencia de la HMG-CoA sintasa de *Myxococcus xanthus* (Número de acceso de UniProt Q1D411) se muestra en la SEQ ID NO: 12. En una realización particularmente preferida, la HMG-CoA sintasa empleada en el procedimiento de la invención tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 12 o presenta una secuencia de aminoácidos que es al menos un x % homóloga a la SEQ ID NO: 12 y tiene la actividad de una HMG-CoA sintasa siendo x un número entero entre 30 y 100, preferentemente 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 en el que dicha enzima es capaz de la condensación de acetil-CoA y acetoacetil-CoA en dicho 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. Con respecto a la determinación del grado de identidad, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente.

Biosíntesis enzimática de acetoacetil-CoA a partir de acetil-CoA (etapa 1 en la Figura 2)

La acetoacetil-CoA que se condensa con acetil-CoA de acuerdo con la presente invención en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente (y que se convierte de acuerdo con la presente invención en 3-metilglutaconil-CoA de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente y que se convierte adicionalmente de acuerdo con la presente invención en 3-metilcrotonil-CoA de acuerdo con

cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente y que se convierte adicionalmente de acuerdo con la presente invención en 3-metilbutiril-CoA de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente y se convierte adicionalmente en alcohol isoamílico de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente que se convierte adicionalmente en acetato de isoamilo de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente) se puede proporcionar por sí misma mediante reacciones enzimáticas.

En una alternativa, de acuerdo con la presente invención, la acetoacetil-CoA puede producirse mediante la condensación enzimática de dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA.

En otra alternativa, la acetoacetil-CoA puede producirse mediante la condensación enzimática de malonil-CoA y acetil-CoA en acetoacetil-CoA.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico (o acetato de isoamilo) a partir de acetil-CoA en la que primero se proporciona acetoacetil-CoA mediante (i) la condensación enzimática de dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA y/o (ii) la condensación enzimática de acetil-CoA y malonil-CoA en acetoacetil-CoA en el que la acetoacetil-CoA y la acetil-CoA se condensan enzimáticamente de manera adicional en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. La 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA se convierte entonces adicionalmente en 3-metilglutaconil-CoA que entonces se convierte adicionalmente en 3-metilcrotonil-CoA. Adicionalmente, la 3-metilcrotonil-CoA se convierte entonces adicionalmente en 3-metilbutiril-CoA. Adicionalmente, la 3-metilbutiril-CoA se convierte adicionalmente entonces en alcohol isoamílico (o adicionalmente a acetato de isoamilo) como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Por lo tanto, en una alternativa (i), la acetoacetil-CoA se puede producir a partir de acetil-CoA como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2013/057194. De acuerdo con la presente invención, acetil-CoA puede convertirse, por ejemplo, en acetoacetil-CoA mediante la siguiente reacción:

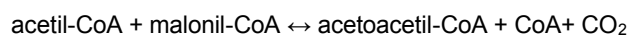


Esta reacción está catalizada por enzimas llamadas acetil-CoA C-acetiltransferasas que se clasifican como EC 2.3.1.9. Estas enzimas catalizan la condensación (tipo Claisen) de dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA. Las enzimas que pertenecen a esta clase de enzimas catalizan la conversión que se muestra anteriormente de dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA que también se ilustra esquemáticamente en la **Figura 12**.

Las enzimas que pertenecen a esta clase y que catalizan la conversión que se muestra anteriormente de dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA y CoA existen en organismos de todos los reinos, es decir, plantas, animales, hongos, bacterias, etc., y se han descrito extensivamente en la bibliografía. Las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos de dichas enzimas se han determinado para una variedad de organismos, como Homo sapiens, Arabidopsis thaliana, E. coli, Bacillus subtilis, Clostridium acetobutylicum y Candida, por nombrar solo unos ejemplos. En principio, cualquier acetil-CoA C-acetiltransferasa (EC 2.3.1.9) se puede utilizar en el contexto de la presente invención. En una realización preferida la enzima es una acetil-CoA acetiltransferasa de Clostridium acetobutylicum (Uniprot P45359). En una realización particularmente preferida, la acetil-CoA acetiltransferasa empleada en el procedimiento de la invención tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 8 o presenta una secuencia de aminoácidos que es al menos un x % homóloga a la SEQ ID NO: 8 y tiene la actividad de una acetil-CoA acetiltransferasa siendo x un número entero entre 30 y 100, preferentemente 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 en el que dicha enzima es capaz de la conversión de acetil-CoA en acetoacetil-CoA como se ha expuesto anteriormente en el presente documento.

Con respecto a la determinación del grado de identidad, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente.

En otra alternativa (ii), la provisión de acetoacetil-CoA se puede conseguir también mediante la conversión enzimática de acetil-CoA y malonil-CoA en acetoacetil-CoA de acuerdo con la siguiente reacción.



Esta reacción es catalizada por una enzima llamada acetoacetil-CoA sintasa (EC 2.3.1.194). Las enzimas que pertenecen a esta clase de enzimas catalizan la conversión presentada anteriormente de una molécula de acetil-CoA y una molécula de malonil-CoA en acetoacetil-CoA y la liberación de concomitante de CO₂. Esta reacción también se ilustra esquemáticamente en la **Figura 12**.

El gen que codifica esta enzima se identificó en el agrupamiento genético de la ruta del mevalonato para la producción de terpenoides en la cepa CL190 aislada del suelo de Streptomyces sp. Gram-positivos (Okamura y col., PNAS USA 107 (2010), .11265-11270, 2010). Además, se ha desarrollado recientemente una ruta biosintética en E. coli utilizando esta enzima para la producción de acetoacetil-CoA (Matsumoto K y col., Biosci. Biotechnol. Biochem, 75 (2011), 364-366).

En consecuencia, en una realización preferida, la conversión enzimática de acetil-CoA en dicha acetoacetil-CoA consiste en una única reacción enzimática en la que la acetil-CoA se convierte directamente en acetoacetil-CoA. Preferentemente, la conversión de acetil-CoA en acetoacetil-CoA se consigue utilizando una acetil-CoA acetiltransferasa (EC 2.3.1.9) como se ha descrito anteriormente.

De manera alternativa, la acetoacetil-CoA también se puede proporcionar mediante una conversión enzimática que comprende dos etapas, es decir;

- (i) la conversión enzimática de acetil-CoA en malonil-CoA; y
- (ii) la conversión enzimática de malonil-CoA y acetil-CoA en acetoacetil-CoA.

Preferentemente, la conversión de acetil-CoA en acetoacetil-CoA se consigue mediante el uso de una acetil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.2). Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



Preferentemente, la conversión enzimática de malonil-CoA y acetil-CoA en acetoacetil-CoA se consigue mediante el uso de una acetoacetil-CoA sintasa (EC 2.3.1.194). En principio, se puede aplicar cualquiera acetil-CoA acetiltransferasa (EC 2.3.1.9), acetil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.2) y/o acetoacetil-CoA sintasa (EC 2.3.1.194) en el procedimiento de acuerdo con la invención. La Figura 12 muestra esquemáticamente las rutas posibles de producción de acetoacetil-CoA a partir de acetil-CoA.

Conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído (etapa 6 en la Figura 2)

La presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción de 3-metilbutiraldehído a partir de 3-metilbutiril-CoA que comprende la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído (etapa 6 que se ilustra en la Figura 2). En un procedimiento preferido para la producción de 3-metilbutiraldehído, la conversión enzimática de dicha 3-metilbutiril-CoA en dicho 3-metilbutiraldehído se consigue utilizando una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de la CoA de la acil-CoA como receptor con el NADH o NADPH como donante (EC 1.2.1.-). En una realización más preferida, la conversión de dicha 3-metilbutiril-CoA en dicho 3-metilbutiraldehído se consigue utilizando una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87).

Con respecto a la realización mencionada anteriormente, para la enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como aceptor con el NADH o NADPH como donante (EC 1.2.1.-), la acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en conexión con los otros procedimientos de la presente invención.

Conversión enzimática directa de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico (etapa 8 en la Figura 2)

La presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico a partir de 3-metilbutiril-CoA que comprende la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico, en el que la 3-metilbutiril-CoA se convierte directamente en alcohol isoamílico. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de alcohol isoamílico (3-metilbutan-1-ol) que comprende la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico, que comprende: una única reacción enzimática en la que la 3-metilbutiril-CoA se convierte directamente en alcohol isoamílico utilizando una acil de cadena corta-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa (etapa 8 que se ilustra en la Figura 2) o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84).

Con respecto a la realización mencionada anteriormente, para la acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84), se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en conexión con los otros procedimientos de la presente invención.

Se puede llevar a cabo un procedimiento de acuerdo con la presente invención in vitro o in vivo. Una reacción in vitro se entiende que es una reacción en la cual no se emplean células, es decir, una reacción acelular. Por lo tanto, in vitro significa preferentemente en un sistema libre de células. La expresión "in vitro" en una realización significa la presencia de enzimas aisladas (o sistemas enzimáticos que comprenden opcionalmente cofactores que posiblemente se necesiten). En una realización, las enzimas empleadas en el procedimiento se utilizan en forma purificada.

Para llevar a cabo el procedimiento in vitro los sustratos para la reacción y las enzimas se incuban en condiciones (tampón, temperatura, cosustratos, cofactores, etc.) permitiendo que las enzimas sean activas y se produzca la conversión enzimática. Se permite que la reacción progrese durante un tiempo suficiente para producir al producto respectivo. La producción de los productos respectivos se puede medir por procedimientos conocidos en la técnica, tal como por cromatografía de gases posiblemente unido a la detección por espectrometría de masas.

Las enzimas pueden estar en cualquier forma adecuada permitiendo que la reacción enzimática tenga lugar. Se pueden purificar o purificar parcialmente o en forma de extractos celulares en bruto o extractos parcialmente purificados. También es posible que las enzimas estén inmovilizadas en un vehículo adecuado.

En otra realización, el procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo en cultivo, en presencia de un organismo, preferentemente un microorganismo, que produce las enzimas descritas anteriormente para las conversiones de los procedimientos de acuerdo con la presente invención como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Se hace referencia a un procedimiento que emplea un microorganismo para llevar a cabo un procedimiento de acuerdo con la invención como un procedimiento "in vivo". Es posible utilizar un microorganismo que produzca naturalmente las enzimas descritas anteriormente para las conversiones de los procedimientos de acuerdo con la presente invención o un microorganismo que se ha modificado genéticamente de manera que expresen (incluso

que sobre expresen) una o más de dichas enzimas. Por lo tanto, el microorganismo puede ser un microorganismo modificado que expresa enzimas descritas anteriormente para las conversiones de los procedimientos de acuerdo con la presente invención, es decir, que tiene en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica dichas enzimas y que se ha modificado para que las sobre exprese. La expresión puede producirse constitutivamente o de una manera inducida o regulada.

En otra realización, el microorganismo puede ser un microorganismo que se ha modificado genéticamente mediante la introducción de una o más moléculas de ácido nucleico que contenga las secuencias de nucleótidos que codifican una o más enzimas descritas anteriormente para las conversiones de los procedimientos de acuerdo con la presente invención. La molécula de ácido nucleico puede estar integrada establemente en el genoma del microorganismo o puede estar presente de manera extracromosómica, por ejemplo, en un plásmido. Dicho microorganismo modificado genéticamente puede ser, por ejemplo, un microorganismo que no expresa naturalmente las enzimas descritas anteriormente para las conversiones de los procedimientos de acuerdo con la presente invención y que se han modificado genéticamente para que expresen dichas enzimas o un microorganismo que expresa naturalmente dichas enzimas y que se ha modificado genéticamente, por ejemplo, transformado con un ácido nucleico, por ejemplo, un vector, que codifica las enzimas respectivas, y/o la inserción de un promotor en frente de la secuencia de nucleótidos endógena que codifica la enzima con el fin de aumentar la actividad respectiva en dicho microorganismo.

Sin embargo, la invención excluye preferentemente los microorganismos de origen natural que se encuentran en la naturaleza que expresa una enzima como se ha descrito anteriormente a niveles como las que existen en la naturaleza.

Al contrario, el microorganismo de la presente invención y que se emplea en el procedimiento de la presente invención es preferentemente un microorganismo de origen no natural, que se ha modificado genéticamente para que exprese (incluyendo que sobre exprese) una enzima exógena de la invención que no existe normalmente en su genoma o que se ha modificado para que sobre exprese una enzima exógena.

Por lo tanto, las enzimas y (micro)organismos empleados en conexión con la presente invención son preferentemente enzimas o (micro)organismos de origen no natural, es decir, son enzimas o (micro)organismos que se diferencian significativa de las enzimas o microorganismos de origen natural y que no existen en la naturaleza. Con respecto a las enzimas, son preferentemente variantes de las enzimas de origen natural que no existen en la naturaleza. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, mutantes preparadas en particular por procedimientos de biología molecular, que presentan propiedades mejoradas, tales como una actividad enzimática más alta, una resistencia a la temperatura mayor y similares. Con respecto a los (micro)organismos, son preferentemente organismos modificados genéticamente como se ha descrito anteriormente en el presente documento que se diferencian de los organismos de origen natural debido a una modificación genética. Los organismos modificados genéticamente son organismos que no son de origen natural, es decir, que no se pueden encontrar en la naturaleza, y que se diferencian sustancialmente de los organismos de origen natural debido a la introducción de una molécula de ácido nucleico ajena.

Al sobre expresar una enzima exógena o endógena como se ha descrito anteriormente en el presente documento, la concentración de la enzima es sustancialmente mayor que la que se encuentra en la naturaleza, que puede entonces forzar inesperadamente la reacción de la presente invención que utiliza una enzima respectiva no natural. Preferentemente, la concentración de la enzima sobre expresada es al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 % o 40 % de la proteína total de la célula huésped.

Un sustrato "no natural" se entiende que es una molécula sobre la que no actúa la respectiva enzima en la naturaleza, incluso aunque pueda coexistir actualmente en el microorganismo junto con la enzima endógena. Este sustrato "no natural" no es convertido por el microorganismo en la naturaleza ya que se prefieren otros sustratos (por ejemplo, el "sustrato natural"). Por lo tanto, la presente invención contempla la utilización de un sustrato no natural con las enzimas descritas anteriormente en un entorno que no se encuentra en la naturaleza.

Por lo tanto, también es posible en el contexto de la presente invención que el microorganismo es un microorganismo que no tiene naturalmente la respectiva actividad enzimática, pero que se ha modificado genéticamente de manera que tenga una secuencia de nucleótidos que permita la expresión de la enzima correspondiente. De manera similar, el microorganismo también puede ser un organismo que tiene naturalmente la respectiva actividad enzimática pero que se han modificado genéticamente de manera que aumenten dicha actividad, por ejemplo, mediante la introducción de una secuencia de nucleótidos exógena que codifique una enzima correspondiente o mediante la introducción de un promotor para la codificación genética endógena de la enzima para aumentar la producción endógena hasta niveles sobre expresados (no naturales).

Si se utiliza un microorganismo que exprese naturalmente una enzima correspondiente, es posible modificar dicho microorganismo de manera que se sobre exprese la actividad respectiva en el microorganismo. Esto se puede conseguir, por ejemplo, efectuando mutaciones en la región promotora del gen correspondiente o la introducción de un promotor de alta expresión de manera que dé lugar a un promotor que asegure una expresión más alta del gen. De manera alternativa, también es posible mutar el gen de manera que dé lugar a una enzima que presente una actividad más alta.

Utilizando microorganismos que expresen las enzimas descritas anteriormente para las conversiones de los procedimientos de acuerdo con la presente invención, es posible llevar a cabo los procedimientos de acuerdo con la invención directamente en el medio de cultivo, sin la necesidad de separar o purificar las enzimas.

En una realización, el organismo empleado en un procedimiento de acuerdo con la invención es un microorganismo que se ha modificado genéticamente para que contenga una molécula de ácido nucleico ajeno que codifique al menos una enzima descrita anteriormente para las conversiones de los procedimientos de acuerdo con la presente invención. El término "ajeno" o "exógeno" en este contexto significa que la molécula de ácido nucleico no es de origen natural en

dicho microorganismo. Esto significa que no existe con la misma estructura o en la misma localización en el microorganismo. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico ajeno es una molécula recombinante que comprende un promotor y una secuencia codificante que codifica la enzima respectiva en la cual el promotor que dirige la expresión de la secuencia codificante es heterólogo con respecto a la secuencia codificante. "Heterólogo" en este contexto significa que el promotor no es el promotor que dirige naturalmente la expresión de dicha secuencia codificante, sino que es un promotor que dirige la expresión naturalmente de una secuencia codificante diferente, es decir, se deriva de otro gen, o es un promotor sintético o un promotor quimérico. Preferentemente, el promotor es un promotor heterólogo respecto al microorganismo, es decir, un promotor que no es de origen natural en el microorganismo respectivo. Más preferentemente, el promotor es un promotor inducible. Los promotores para la dirección de la expresión en diferentes tipos de organismos, en particular en microorganismos, son bien conocidos por el experto en la técnica.

En una realización adicional, la molécula de ácido nucleico es ajena al microorganismo en el que la enzima que se codifica no es endógena del microorganismo, es decir, no se expresa naturalmente por el microorganismo cuando no está modificado genéticamente. En otras palabras, la enzima codificada es heteróloga con respecto al microorganismo. La molécula de ácido nucleico ajeno puede estar presente en el microorganismo en forma extracromosómica, por ejemplo, como un plásmido, o integrada establemente en el cromosoma. Se prefiere una integración estable. Por lo tanto, la modificación genética puede consistir, por ejemplo, en la integración de los genes correspondientes que codifican las enzimas en el cromosoma, o en la expresión de las enzimas a partir de un plásmido que contiene un promotor corriente arriba de la secuencia codificante de la enzima, preferentemente originándose el promotor y la secuencia codificante de diferentes organismos, o en por cualquier otro procedimiento conocido por el experto en la técnica.

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

También es posible emplear una bacteria extremófila tal como *Thermus thermophilus*, o bacterias anaerobias de la familia Clostridiae.

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

En otra realización, el procedimiento de acuerdo con la invención utiliza un microorganismo fotosintético que expresa al menos una enzima para la conversión de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, el microorganismo es una bacteria fotosintética, una microalga. En una realización adicional, el microorganismo es un alga, más preferentemente un alga que pertenece a las diatomeas.

También se puede concebir para el uso en el procedimiento de acuerdo con la invención una combinación de microorganismos en la que diferentes microorganismos expresen diferentes enzimas como se ha descrito anteriormente. La modificación genética de microorganismos para que expresen una enzima de interés también se describirá adicionalmente con más detalle posteriormente.

En una realización preferida, el procedimiento de la presente invención utiliza un organismo, preferentemente un microorganismo, que se modifica genéticamente con el fin de evitar la fuga de acetil-CoA aumentando de esta manera la concentración de acetil-CoA. Las modificaciones genéticas que dan lugar a un aumento de la concentración intracelular de acetil-CoA se conocen en la técnica. Sin estar ligados por teoría alguna, tal como un organismo, preferentemente un microorganismo, puede modificarse genéticamente de manera preferible eliminando o inactivando los siguientes genes:

Δ ackA (acetato cinasa), Δ ldh (lactato deshidrogenasa), Δ adhE (alcohol deshidrogenasa), Δ frdB y/o Δ frdC (fumarato reductasa y fumarato deshidrogenasa).

De manera alternativa, o además de cualquiera de las eliminaciones anteriores, el organismo o microorganismo puede modificarse genéticamente sobre expresando el gen *pank/coaA* que codifica la pantotenato cinasa, aumentando de esta manera el agrupamiento intracelular de CoA/acetil-CoA.

Estas modificaciones que evitan la fuga de acetil-CoA se conocen en la técnica y se han utilizado los organismos modificados correspondientes en los procedimientos para la bioconversión de alcohol isoamílico exógeno en acetato de isoamilo por una cepa de *E. coli* que expresa ATF2 (Metab. Eng. 6 (2004), 294-309).

En otra realización, el procedimiento de la invención comprende la etapa de provisión del organismo, preferentemente el microorganismo que tiene la respectiva actividad enzimática o actividades en forma de un cultivo celular líquido, una etapa posterior de cultivo del organismo, preferentemente el microorganismo en un fermentador (al que también a menudo se hace referencia como biorreactor) en condiciones adecuadas que permitan la expresión de la enzima respectiva y que comprende la etapa de efectuar la conversión enzimática de un procedimiento de la invención como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Los dispositivos fermentadores o biorreactores adecuados y

condiciones de fermentación son conocidos por el experto en la técnica. Un biorreactor o un fermentador se refiere a cualquier dispositivo o sistema fabricado o modificado conocido en la técnica que mantiene un entorno biológicamente activo. Por lo tanto, un biorreactor o fermentador puede ser un vaso en el que se lleva a cabo un procedimiento químico/bioquímico como el procedimiento de la presente invención que implica los organismos, preferentemente microorganismos y/o sustancias bioquímicamente activas, es decir, las enzimas descritas anteriormente derivadas de dichos organismos u organismos que albergan las enzimas descritas anteriormente. En un biorreactor o un fermentador, este procedimiento puede ser aeróbico o anaeróbico. Estos biorreactores son normalmente cilíndricos y pueden variar de tamaño desde litros a metros cúbicos y a menudo están fabricados en acero inoxidable. A este respecto, sin estar ligados por teoría alguna, el fermentador o biorreactor puede diseñarse de manera que sea adecuado para cultivar los organismos, preferentemente microorganismos, por ejemplo, en un cultivo discontinuo, cultivo semi-continuo, cultivo de perfusión o cultivo quimiostático, que se conocen todos en la técnica. El medio de cultivo puede ser cualquier medio de cultivo adecuado para el cultivo del respectivo organismo o microorganismo.

En una realización preferida el procedimiento de acuerdo con la presente invención también comprende la etapa de recuperación del alcohol isoamílico (o acetato de isoamilo) producido por el procedimiento. Por ejemplo, si el procedimiento de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo in vivo fermentando el microorganismo correspondiente que expresa las enzimas necesarias, el alcohol isoamílico (o el acetato isoamílico) se puede recuperar por extracción en disolvente líquido/líquido. De manera alternativa, el alcohol isoamílico (o acetato de isoamilo) se puede recuperar por un proceso de separación como se ha descrito para la extracción del butanol o isobutanol de los biorreactores. Dichos procedimientos de recuperación son conocidos por el experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Appl. Microbiol. Biotechnol. 90 (2011), 1681-1690 que describe ejemplarmente un procedimiento de fermentación para la producción de isobutanol por *E. coli* y su recuperación mediante un procedimiento de extracción por gas.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el presente documento en el que se emplea un microorganismo como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en el que el microorganismo es capaz de convertir enzimáticamente la acetil-CoA en alcohol isoamílico (y preferentemente de manera adicional en acetato de isoamilo), en el que dicho procedimiento comprende el cultivo del microorganismo en un medio de cultivo.

Las enzimas que se utilizan en el procedimiento de acuerdo con la invención pueden ser enzimas de origen natural o enzimas que se derivan de enzimas de origen natural, por ejemplo, mediante la introducción de mutaciones u otras alteraciones que, por ejemplo, alteran o mejoran la actividad enzimática, la estabilidad, etc.

Los procedimientos para la modificación y/o mejora de las actividades enzimáticas deseadas de proteínas se conocen bien por el experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, la mutagénesis aleatoria o la mutagénesis dirigida al sitio y la selección posterior de enzimas que tienen las propiedades o estrategias deseadas de la denominada "evolución dirigida".

Por ejemplo, para la modificación genética en células procariontas, se puede introducir una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima correspondiente en plásmidos que permite la mutagénesis o modificación de secuencia mediante recombinación de secuencias de ADN. Los procedimientos convencionales (véase Sambrook y Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) permiten intercambio de bases que se va a llevar a cabo o las secuencias naturales o sintéticas que se van a añadir. Los fragmentos de ADN se pueden ligar utilizando adaptadores y engarces complementarios a los fragmentos. Además, se pueden utilizar medidas de modificación que proporcionen sitios de restricción adecuados para retirar el ADN superfluo o sitios de restricción. En los casos, en los que las inserciones, eliminaciones o sustituciones son posibles, se pueden utilizar la mutagénesis *in vitro*, "reparación de cebador", restricción o ligadura. En general, un análisis de secuencia, un análisis de restricción y otros procedimientos de bioquímica y biología molecular se llevan a cabo como procedimientos de análisis. Las variantes enzimáticas resultantes se ensayan entonces en cuanto a la actividad deseada, por ejemplo, la actividad enzimática, con un ensayo descrito anteriormente y en particular en cuanto al su aumento de actividad enzimática.

Como se ha descrito anteriormente, el microorganismo empleado en un procedimiento de la invención o contenido en la composición de la invención puede ser un microorganismo que se ha modificado genéticamente mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima correspondiente. Por lo tanto, en una realización preferida, el microorganismo es un microorganismo recombinante que se ha modificado genéticamente para que tenga un aumento de actividad de al menos una enzima descrita anteriormente para las conversiones del procedimiento de acuerdo con la presente invención. Esto se puede conseguir transformando, por ejemplo, el microorganismo con un ácido nucleico que codifica una enzima correspondiente. Una descripción detallada de la modificación genética de los microorganismos se dará adicionalmente con posterioridad.

Preferentemente, la molécula de ácido nucleico introducida en el microorganismo es una molécula de ácido nucleico que es heteróloga con respecto al microorganismo, es decir, no es de origen natural en dicho microorganismo. En el contexto de la presente invención, un "aumento de actividad" significa que la expresión y/o la actividad de una enzima en el microorganismo modificado es al menos un 10 %, preferentemente al menos un 20 %, más preferentemente al menos un 30 % o 50 %, más preferentemente al menos un 70 % o 80 % y particularmente más preferentemente al menos un 90 % o 100 % mayor que en el microorganismo no modificado correspondiente. En realizaciones más preferidas, el aumento de expresión y/o actividad puede ser al menos de un 150 %, al menos un 200 % o al menos un

500 %. En realizaciones particularmente preferidas, la expresión es al menos 10 veces, más preferentemente al menos 100 veces e incluso más preferentemente al menos 1000 veces mayor que en el microorganismo no modificado correspondiente.

5 El término expresión/actividad "aumentada" también cubre la situación en la que el microorganismo no modificado correspondiente no expresa una enzima correspondiente de manera que la expresión/actividad correspondiente en el microorganismo no modificado es cero. Preferentemente, la concentración de la enzima sobre expresada es al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 % o 40 % de la proteína total de la célula huésped.

10 Los procedimientos para la medición del nivel de expresión de una proteína determinada en una célula son bien conocidos por el experto en la técnica. En una realización, la medición del nivel de expresión se hace midiendo la cantidad de la proteína correspondiente. Los procedimientos correspondientes son bien conocidos por el experto en la técnica e incluyen la transferencia de Western, ELISA, etc. En otra realización la medición del nivel de expresión se hace midiendo la cantidad del ARN correspondiente. Los procedimientos correspondientes son bien conocidos por el experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, la transferencia de Northern.

15 En el contexto de la presente invención, el término "recombinante" significa que el microorganismo está modificado genéticamente de manera que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima como se ha definido anteriormente en comparación con un microorganismo no modificado de tipo silvestre. Una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima como se ha definido anteriormente se puede utilizar sola o como parte de un vector.

20 Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender adicionalmente las secuencias de control de la expresión unidas operativamente al polinucleótido comprendido en la molécula de ácido nucleico. La expresión "unida operativamente" o "unida operablemente", como se utiliza a lo largo de la presente descripción, se refiere a una unión entre una o más secuencias de control de la expresión y la región codificante del polinucleótido que se va a expresar de tal manera que se consigue la expresión en condiciones compatibles con la secuencia de control de la expresión.

25 La expresión comprende la transcripción de la secuencia de ADN heterólogo, preferentemente en un ARN que se pueda traducir. Los elementos reguladores que aseguran la expresión en hongos, así como en bacterias, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Engloban los promotores, amplificadores, señales de terminación, señales de direccionamiento y similares. Se dan posteriormente ejemplos adicionales en conexión con las explicaciones que conciernen a los vectores.

30 Los promotores para su uso en conexión con la molécula de ácido nucleico pueden ser homólogos o heterólogos con respecto a su origen y/o con respecto al gen que se va a expresar. Los promotores adecuados son, por ejemplo, promotores que se presentan a la expresión constitutiva. Sin embargo, los promotores que solo se activan en un momento determinado por influencias externas también se pueden utilizar. Se pueden utilizar promotores artificiales o inducibles químicamente en este contexto. Los vectores pueden comprender adicionalmente secuencias de control de la expresión unidas operativamente a dichos polinucleótidos contenidos en los vectores. Estas secuencias de control de la expresión pueden ser adecuadas para asegurar la transcripción y la síntesis de un ARN que se pueda traducir en bacterias u hongos.

35 Además, es posible insertar diferentes mutaciones en los polinucleótidos mediante procedimientos habituales en biología molecular (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA), dando lugar a la síntesis de polipéptidos que tengan posiblemente propiedades biológicas modificadas. Se puede concebir la introducción de mutaciones puntuales en posiciones en las que una modificación de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, tenga influencia sobre la actividad biológica o la regulación del polipéptido.

40 Además, se pueden preparar mutantes que posean una especificidad de sustrato o producto modificada. Preferentemente, dichos mutantes presentan un aumento de actividad. De manera alternativa, se pueden preparar mutantes cuya actividad catalítica esté abolida sin perder la actividad de unión al sustrato.

45 Además, la introducción de mutaciones en los polinucleótidos que codifican una enzima como se ha definido anteriormente permite que se reduzca o aumente la tasa de expresión genética y/o la actividad de las enzimas codificadas por dichos polinucleótido.

50 Para las bacterias u hongos modificados genéticamente, los polinucleótidos que codifican una enzima como se ha definido anteriormente o partes de estas moléculas se pueden introducir en plásmidos que permitan la mutagénesis o modificación de secuencia mediante recombinación de secuencias de ADN. Los procedimientos convencionales (véase Sambrook y Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) permiten intercambio de bases que se va a llevar a cabo o las secuencias naturales o sintéticas que se van a añadir. Los fragmentos de ADN se pueden conectar entre ellos aplicando adaptadores o engarces a los fragmentos. Además, se pueden utilizar medidas de modificación que proporcionen sitios de restricción adecuados para retirar el ADN superfluo o sitios de restricción. En los casos, en los que las inserciones, eliminaciones o sustituciones son posibles, se pueden utilizar la mutagénesis *in vitro*, "reparación de cebador", restricción o ligadura. En general, un análisis de secuencia, un análisis de restricción y otros procedimientos de bioquímica y biología molecular se llevan a cabo como procedimientos de análisis.

60 Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención se puede producir un microorganismo recombinante modificando genéticamente hongos o bacterias que comprende la introducción de los polinucleótidos, moléculas de ácido nucleico o vectores descritos anteriormente en un hongo o una bacteria.

El polinucleótido que codifica la enzima respectiva se expresa de manera que da lugar a la producción de un polipéptido que tiene cualquiera de las actividades descritas anteriormente. Una visión de los diferentes sistemas de expresión está contenida, por ejemplo, en *Methods in Enzymology* 153 (1987), 385-516, in Bitter y col. (*Methods in*

Enzymology 153 (1987), 516-544) y in Sawers y col. (Applied Microbiology and Biotechnology 46 (1996), 1-9), Billman-Jacobe (Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 500-4), Hockney (Trends in Biotechnology 12 (1994), 456-463), Griffiths y col., (Methods in Molecular Biology 75 (1997), 427-440). Una visión de los sistemas de expresión en levaduras se da, por ejemplo, en Hensing y col. (Antonie van Leeuwenhoek 67 (1995), 261-279), Bussineau y col. (Developments in Biological Standardization 83 (1994), 13-19), Gellissen y col. (Antonie van Leeuwenhoek 62 (1992), 79-93), Fleer (Current Opinion in Biotechnology 3 (1992), 486-496), Vedvick (Current Opinion in Biotechnology 2 (1991), 742-745) y Buckholz (Bio/Technology 9 (1991), 1067-1072). Los vectores de expresión se han descrito ampliamente en la bibliografía. Como norma, contienen no solo un indicador genético y un origen de replicación que asegure la replicación en el huésped seleccionado, sino que también un promotor bacteriano o vírico, y en la mayoría de los casos una señal de terminación de la transcripción. Entre el promotor y la señal de terminación existe en general al menos un sitio de restricción o un poliengarce que hace posible la inserción de una secuencia de ADN codificante. La secuencia de ADN que controla naturalmente la transcripción del gen correspondiente puede utilizarse como secuencia promotora, si es activa en el organismo huésped seleccionado. Sin embargo, esta secuencia también se puede intercambiar por otras secuencias promotoras. Es posible utilizar promotores que aseguren la expresión constitutiva del gen y promotores inducibles que permitan un control deliberado de la expresión del gen. Las secuencias promotoras bacterianas y víricas poseen estas propiedades que están descritas con detalle en la bibliografía. Las secuencias reguladoras para la expresión en microorganismos (por ejemplo, *E. coli*, *S. cerevisiae*) se describen suficientemente en la bibliografía. Los promotores que permiten una expresión particularmente alta de una secuencia corriente abajo son, por ejemplo, el promotor T7 (Studier y col., Methods in Enzymology 185 (1990), 60-89), lacUV5, trp, trp-lacUV5 (DeBoer y col., en Rodriguez y Chamberlin (Eds), Promoters, Structure and Function; Praeger, New York, (1982), 462-481; DeBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983), 21-25), lp1, rac (Boros y col., Gene 42 (1986), 97-100). Se utilizan promotores inducibles preferentemente para la síntesis de polipéptidos. Estos promotores a menudo dan lugar a rendimientos de polipéptido mayores que los promotores constitutivos. Con el fin de obtener una cantidad de polipéptido óptima, a menudo se utiliza un procedimiento en dos etapas. Primero, se cultivan las células huésped en condiciones óptimas hasta una densidad celular relativamente alta. En la segunda etapa, se induce la transcripción dependiendo del tipo de promotor utilizado. A este respecto, es particularmente adecuado un promotor tac que puede inducirse mediante lactosa o IPTG (= isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) (deBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983), 21-25). Las señales de terminación de la transcripción también se han descrito en la bibliografía. La transformación de la célula huésped con un polinucleótido o vector como se ha descrito anteriormente se puede llevar a cabo mediante procedimientos convencionales, como se describe, por ejemplo, en Sambrook y Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA; Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990. La célula huésped se cultiva en medios nutritivos que cubran las necesidades de la célula huésped particular que se utilice, en particular con respecto al valor del pH, temperatura, concentración de sales, aireación, antibióticos, vitaminas, elementos traza, etc.

La presente invención también se refiere a un organismo o microorganismo recombinante que sea capaz de expresar varias de las enzimas descritas anteriormente necesarias para la conversión enzimática de acetil-CoA en alcohol isoamílico (o acetato de isoamilo).

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un organismo o microorganismo recombinante que expresa

- (i) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído como se ha definido anteriormente en el que dicha enzima es una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87) (etapa 6 que se muestra en la Figura 2);
- (ii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilbutiraldehído en alcohol isoamílico como se ha definido anteriormente (etapa 7 que se muestra en la Figura 2);
- (iii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA (etapa 4 que se muestra en la Figura 2); y
- (iv) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA (etapa 5 que se muestra en la Figura 2).

En una realización preferida, el organismo o microorganismo recombinante que expresa (i) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído como se ha definido anteriormente (etapa 6 en la Figura 2); (ii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilbutiraldehído en alcohol isoamílico como se ha definido anteriormente (etapa 7 que se muestra en la Figura 2); (iii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA (etapa 4 que se muestra en la Figura 2); y (iv) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA (etapa 5 que se muestra en la Figura 2) es un organismo o microorganismo recombinante, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de dicha 3-metilbutiril-CoA en dicho 3-metilbutiraldehído (etapa 6 que se muestra en la Figura 2) es una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil CoA como receptor con el NADH o NADPH como donante como se ha definido anteriormente en el presente documento.

En una realización preferida, este organismo o microorganismo recombinante es un organismo o microorganismo recombinante, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de dicha 3-metilbutiril-CoA en dicho 3-metilbutiraldehído (etapa 6 que se muestra en la Figura 2) es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC

1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87) como se ha definido anteriormente.

En una realización preferida, el organismo o microorganismo recombinante que expresa (i) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído como se ha definido anteriormente (etapa 6 en la Figura 2); (ii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilbutiraldehído en alcohol isoamílico como se ha definido anteriormente (etapa 7 que se muestra en la Figura 2); (iii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA (etapa 4 que se muestra en la Figura 2); y (iv) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA (etapa 5 que se muestra en la Figura 2) es un organismo o microorganismo recombinante, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de dicho 3-metilbutiraldehído en dicho alcohol isoamílico (etapa 7 que se muestra en la Figura 2) es una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH o NADPH como donante como se ha definido anteriormente.

En una realización preferida, este organismo o microorganismo recombinante es un organismo o microorganismo recombinante, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de dicho 3-metilbutiraldehído en dicho alcohol isoamílico (etapa 7 que se muestra en la Figura 2) es una 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), una alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) o una o una deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2) como se ha definido anteriormente.

En una realización preferida, el organismo o microorganismo recombinante que expresa (i) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído como se ha definido anteriormente (etapa 6 en la Figura 2); (ii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilbutiraldehído en alcohol isoamílico como se ha definido anteriormente (etapa 7 que se muestra en la Figura 2); (iii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA (etapa 4 que se muestra en la Figura 2); y (iv) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA (etapa 5 que se muestra en la Figura 2) es un organismo o microorganismo recombinante, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA (etapa 4 que se muestra en la Figura 2) es una enzima que es una 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.4), geranoil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.5) o una glutaconil-CoA decarboxilasa (EC 4.1.1.70).

En una realización preferida, el organismo o microorganismo recombinante que expresa (i) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído como se ha definido anteriormente (etapa 6 en la Figura 2); (ii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilbutiraldehído en alcohol isoamílico como se ha definido anteriormente (etapa 7 que se muestra en la Figura 2); (iii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA (etapa 4 que se muestra en la Figura 2); y (iv) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA (etapa 5 que se muestra en la Figura 2) es un organismo o microorganismo recombinante, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de dicho 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA de acuerdo con (iv) es una enzima que se clasifica como EC 1.3.-.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH como se ha definido anteriormente.

En una realización preferida, el organismo o microorganismo recombinante es un organismo o microorganismo, en el que la enzima clasificada como EC 1.3.-.- se selecciona de entre el grupo que consiste en

- (i) una acil-CoA deshidrogenasa (NADP+) (EC 1.3.1.8);
- (ii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.10);
- (iii) una cis-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.37);
- (iv) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.38);
- (v) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Re) (EC 1.3.1.39);
- (vi) crotonil-CoA reductasa (EC 1.3.1.86);
- (vii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADH) (EC 1.3.1.9);
- (viii) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD+) (EC 1.3.1.44); y
- (ix) una isovaleril-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.8.4) como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

En un aspecto adicional, el organismo o microorganismo recombinante anterior que expresa adicionalmente una enzima capaz de la conversión enzimática del alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo) como se ha definido anteriormente (etapa 9 que se muestra en la Figura 2).

En una realización preferida, el organismo o microorganismo recombinante anterior que expresa adicionalmente una enzima capaz de la conversión enzimática de alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo) como se ha definido anteriormente (etapa 9 que se muestra en la Figura 2) es un organismo o microorganismo recombinante, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo) es una alcohol-O-acetil-transferasa (EC 2.3.1.84) como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un organismo o microorganismo recombinante que expresa

- (i) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa como se ha descrito anteriormente (etapa 8 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) como se ha descrito anteriormente en el presente documento;
- (ii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA como se ha descrito

anteriormente en el presente documento (etapa 5 que se muestra en la Figura 2); y
 (iii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA (etapa 4 que se muestra en la Figura 2).

5 En una realización preferida, el organismo o microorganismo recombinante que expresa (i) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa como se ha descrito anteriormente en el presente documento (etapa 8 que se muestra en la Figura 2) o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) como se ha descrito anteriormente en el presente documento; y
 10 (ii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA como se ha descrito anteriormente en el presente documento (etapa 5 que se muestra en la Figura 2); y (iii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA (etapa 4 que se muestra en la Figura 2) es un organismo o microorganismo recombinante, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA de acuerdo con (ii) es una enzima que se clasifica como EC 1.3.-.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo CH-CH como se ha descrito anteriormente en el presente documento.
 15 En una realización preferida adicional, el organismo o microorganismo recombinante es un organismo o microorganismo recombinante, en el que la enzima clasificada como EC 1.3.-.- se selecciona de entre el grupo que consiste en

- (i) una acil-CoA deshidrogenasa (NADP⁺) (EC 1.3.1.8);
- (ii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.10);
- (iii) una cis-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.37);
- 20 (iv) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.38);
- (v) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Re) (EC 1.3.1.39);
- (vi) crotonil-CoA reductasa (EC 1.3.1.86);
- (vii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADH) (EC 1.3.1.9);
- (viii) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD⁺) (EC 1.3.1.44); y
- 25 (ix) una isovaleril-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.8.4).

En una realización preferida, el organismo o microorganismo recombinante que expresa (i) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa como se ha descrito anteriormente en el presente documento (etapa 8 que se muestra en la Figura 2) o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) como se ha descrito anteriormente en el presente documento; y
 30 (ii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA como se ha descrito anteriormente en el presente documento (etapa 5 que se muestra en la Figura 2); y (iii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA (etapa 4 que se muestra en la Figura 2) es un organismo o microorganismo recombinante, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA de acuerdo con (iii) es una enzima que es una 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.4), geranoil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.5) o una glutaconil-CoA descarboxilasa (EC 4.1.1.70).

En un aspecto adicional, el organismo o microorganismo recombinante anterior que expresa adicionalmente una enzima capaz de la conversión enzimática del alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo) como se ha definido anteriormente (etapa 9 que se muestra en la Figura 2).

40 En una realización preferida, el organismo o microorganismo recombinante anterior que expresa adicionalmente una enzima capaz de la conversión enzimática de alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo) como se ha definido anteriormente (etapa 9 que se muestra en la Figura 2) es un organismo o microorganismo recombinante, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo) es una alcohol-O-acetil-transferasa (EC 2.3.1.84) como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

45 El microorganismo preferentemente es una bacteria, una levadura o un hongo. En otra realización preferida, el organismo es una planta o un animal no humano. Con respecto a otras realizaciones preferidas de la bacteria, organismo recombinante, o microorganismo, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en conexión con los procedimientos de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se refiere además al uso de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87) (etapa 6 que se muestra en la Figura 2) o un organismo o microorganismo que expresa dicha enzima, para la conversión de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído. En una realización preferida, dicha enzima, es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC
 50 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87).

Con respecto a la enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como aceptor con el NADH o NADPH como donante, la acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10), la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87) y el organismo o microorganismo, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en conexión con los procedimientos y los
 60 organismos o microorganismos de acuerdo con la presente invención.

Además, la presente invención se refiere al uso

(i) de una combinación de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87) (etapa 6 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), y una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante (etapa 7 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), una alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) o una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), o

(ii) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) (etapa 8 que se muestra en la Figura 2)

para la conversión de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico.

Con respecto a la enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, la acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), la enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante, la 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), la alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), la acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa y la acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84), se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en conexión con los procedimientos de acuerdo con la presente invención.

En correspondencia, la presente divulgación se refiere además al uso

(i) de un organismo o microorganismo que expresa una combinación de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87) (etapa 6 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), y una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante (etapa 7 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), una alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) o una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), o

(ii) de un organismo o microorganismo que expresa una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) (etapa 8 que se muestra en la Figura 2)

para la conversión de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico.

Con respecto a la enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, la acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10), la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), la enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante, la 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), la alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), la acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa y la acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84), así como el organismo o microorganismo, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en conexión con los procedimientos y/o los organismos o microorganismos de acuerdo con la presente invención.

Además, la presente invención se refiere al uso de una combinación que comprende

(i) una oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-) (etapa 5 que se muestra en la Figura 2), y

(ii) una combinación de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87) (etapa 6 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), y una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído

como receptor con el NADH y NADPH como donante (etapa 7 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), una alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) o una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), o

5 (iii) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) (etapa 8 que se muestra en la Figura 2);

para la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en alcohol isoamílico.

10 Con respecto a la oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-), la enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, la acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10), la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), la enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante, la 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), la alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), la acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa y la acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84), se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en conexión con los procedimientos de acuerdo con la presente invención.

15 En una realización preferida adicional, la presente invención se refiere al uso de una combinación que comprende (i) una oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-) (etapa 5 que se muestra en la Figura 2), y (ii) una combinación de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante (etapa 6 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10), la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), y una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante (etapa 7 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), una alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), o una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), o (iii) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) (etapa 8 que se muestra en la Figura 2); para la conversión de 3-metilcrotonil-CoA en alcohol isoamílico;

20 en el que la oxidorreductasa actúa sobre un grupo CH-CH como donante (EC 1.3.-) de acuerdo con (i) se selecciona de entre el grupo que consiste en:

25 (i) una acil-CoA deshidrogenasa (NADP+) (EC 1.3.1.8); (ii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.10); (iii) una cis-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.37); (iv) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.38); (v) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Re) (EC 1.3.1.39); (vi) crotonil-CoA reductasa (EC 1.3.1.86); (vii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADH) (EC 1.3.1.9); (viii) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD⁺) (EC 1.3.1.44); y (ix) una isovaleril-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.8.4). Con respecto a las enzimas, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en conexión con los procedimientos de acuerdo con la presente invención.

30 En correspondencia, la presente divulgación se refiere además al uso de un organismo o microorganismo que expresa una combinación que comprende

40 (i) una oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-) (etapa 5 que se muestra en la Figura 2), y (ii) una combinación de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87) (etapa 6 que se muestra en la Figura 2), y
45 una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante (etapa 7 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), una alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) o una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), o
50 (iii) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) (etapa 8 que se muestra en la Figura 2);

para la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en alcohol isoamílico.

55 Con respecto a la oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-), la enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, la acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10), la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), la enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante, la 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), la alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), la acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa y la acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84), se aplica lo mismo que se ha
60

expuesto anteriormente en conexión con los procedimientos. Los organismos y los microorganismos de acuerdo con la presente invención.

En una realización preferida adicional, la presente invención se refiere al uso de un organismo o microorganismo que expresa una combinación que comprende (i) una oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-) (etapa 5 que se muestra en la Figura 2), y (ii) una combinación de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante (etapa 6 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10), la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), y una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante (etapa 7 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), una alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), o una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), o (iii) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) (etapa 8 que se muestra en la Figura 2); para la conversión de 3-metilcrotonil-CoA en alcohol isoamílico; en el que la oxidorreductasa actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-) de acuerdo con (i) se selecciona de entre el grupo que consiste en: (i) una acil-CoA deshidrogenasa (NADP+) (EC 1.3.1.8); (ii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.10); (iii) una cis-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.37); (iv) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.38); (v) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Re) (EC 1.3.1.39); (vi) crotonil-CoA reductasa (EC 1.3.1.86); (vii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADH) (EC 1.3.1.9); (viii) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD⁺) (EC 1.3.1.44); y (ix) una isovaleril-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.8.4). Con respecto a estas enzimas, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en conexión con los procedimientos, organismos y microorganismos de acuerdo con la presente invención.

En otro aspecto, la presente divulgación también se refiere a una composición que comprende:

(a) 3-metilbutiril-CoA; y
 (b) una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante (etapa 6 que se muestra en la Figura 2) o un organismo o microorganismo que expresa dicha enzima.
 Dicha enzima, es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87).

Con respecto a la enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con el NADH o NADPH como donante, la acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10), la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87) y el organismo o microorganismo, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en conexión con los procedimientos y los organismos o microorganismos de acuerdo con la presente invención.

Además, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende:

(a) 3-metilbutiril-CoA; y
 (b)
 (i) una combinación de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante (etapa 6 que se muestra en la Figura 2), en el que dicha enzima es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), y una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante (etapa 7 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), una alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) o una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), o
 (ii) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) (etapa 8 que se muestra en la Figura 2).

Con respecto a la enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, la acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10), la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), la enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante, la 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), la alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), la acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa y la acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84), se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en conexión con los procedimientos de acuerdo con la presente invención.

En correspondencia, la presente divulgación se refiere además a una composición que comprende:

- (a) 3-metilbutiril-CoA; y
- (b)

- 5 (i) un organismo o microorganismo que expresa una combinación de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante (etapa 6 que se muestra en la Figura 2), en el que dicha enzima es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10), la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), y una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante (etapa 7 que se muestra en la Figura 2),
 10 preferentemente una 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), una alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), o una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), o
 (ii) un organismo o microorganismo que expresa una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) (etapa 8 que se muestra en la Figura 2).

- 15 Con respecto a la enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, la acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10), la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), la enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante, la 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), la alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), la acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa y la acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84), así como el organismo o microorganismo, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en conexión con los procedimientos y/o los organismos o microorganismos de acuerdo con la presente invención.

- 25 Además, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende:

- (a) 3-metilcrotonil-CoA; y
- (b) una combinación que comprende

- 30 (i) una oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-.-) (etapa 5 que se muestra en la Figura 2), y
 (ii) una combinación de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante (etapa 6 que se muestra en la Figura 2), en el que dicha enzima es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10), la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), y una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante (etapa 7 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), una alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), o una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), o
 35 (iii) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) (etapa 8 que se muestra en la Figura 2).

- 45 Con respecto a la oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-.-), la enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, la acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10), la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), la enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante, la 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), la alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), la acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa y la acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84), se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en conexión con los procedimientos de acuerdo con la presente invención.

- 50 Se desvela adicionalmente una composición que comprende

- (a) 3-metilcrotonil-CoA; y
- (b) una combinación que comprende (i) una oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-.-) (etapa 5 que se muestra en la Figura 2), y (ii) una combinación de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante (etapa 6 que se muestra en la Figura 2), en que dicha enzima es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10), la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), y una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante (etapa 7 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una 3-metilbutanal

reductasa (EC 1.1.1.265), una alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), o una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), o (iii) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) (etapa 8 que se muestra en la Figura 2);

- 5 en el que la oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-) de acuerdo con (i) se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) una acil-CoA deshidrogenasa (NADP+) (EC 1.3.1.8); (ii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.10); (iii) una cis-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.37); (iv) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.38); (v) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Re) (EC 1.3.1.39); (vi) crotonil-CoA reductasa (EC 1.3.1.86); (vii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADH) (EC 1.3.1.9); (viii) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD⁺) (EC 1.3.1.44); y (ix) una isovaleril-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.8.4). Con respecto a las enzimas, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en conexión con los procedimientos de acuerdo con la presente invención.

En correspondencia, la presente divulgación se refiere además a una composición que comprende:

- 15 (a) 3-metilcrotonil-CoA; y
(b) un organismo o microorganismo que expresa una combinación que comprende:
- (i) una oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-) (etapa 5 que se muestra en la Figura 2), y
(ii) una combinación de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante (etapa 6 que se muestra en la Figura 2), en el que dicha enzima es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10), la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), y una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante (etapa 7 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), una alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), o una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), o
(iii) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) (etapa 8 que se muestra en la Figura 2).

30 Con respecto a la oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-), la enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, la acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10), la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), la enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante, la 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), la alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), la acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa y la acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84), se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en conexión con los procedimientos. Los organismos y los microorganismos de acuerdo con la presente invención.

En aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende

- 40 (a) 3-metilcrotonil-CoA; y
(b) un organismo o microorganismo que expresa una combinación que comprende (i) una oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-) (etapa 5 que se muestra en la Figura 2), y (ii) una combinación de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante (etapa 6 que se muestra en la Figura 2), en que dicha enzima es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10), la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), y una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH y NADPH como donante (etapa 7 que se muestra en la Figura 2), preferentemente una 3-metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265), una alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), o una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (EC 1.1.1.2), o (iii) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84) (etapa 8 que se muestra en la Figura 2);

55 en el que la oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-) de acuerdo con (i) se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) una acil-CoA deshidrogenasa (NADP+) (EC 1.3.1.8); (ii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.10); (iii) una cis-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.37); (iv) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.38); (v) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Re) (EC 1.3.1.39); (vi) crotonil-CoA reductasa (EC 1.3.1.86); (vii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADH) (EC 1.3.1.9); (viii) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD⁺) (EC 1.3.1.44); y (ix) una isovaleril-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.8.4). Con respecto a estas enzimas, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en conexión con los procedimientos, organismos y microorganismos de acuerdo con la presente

invención.

- Figura 1:** Descarboxilación de origen natural de un alfa-ceto ácido (2-ceto-isocaproato) en 3-metilbutanal.
- 5 **Figura 2:** Se muestra una ruta metabólica adicional para la producción de alcohol isoamílico (o acetato de isoamilo) a partir de acetil-CoA mediante acetoacetil-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, 3-metilglutaconil-CoA, 3-metilbut-2-enoil-CoA, 3-metilbutiril-CoA y 3-metilbutiraldehído o una ruta alternativa para la producción de alcohol isoamílico (o acetato de isoamilo) a partir de acetil-CoA mediante acetoacetil-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, 3-metilglutaconil-CoA, 3-metilbut-2-enoil-CoA y 3-metilbutiril-CoA.
- 10 **Figura 3:** Reacciones esquemáticas para las conversiones alternativas de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico.
- Figura 4:** Reacción esquemática para la reducción del tioéster de Coenzima A de la 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído.
- 15 **Figura 5:** Reacción esquemática de la conversión enzimática de 3-metilbutiraldehído (3-metilbutanal) en alcohol isoamílico (3-metilbutanol).
- Figura 6:** Reacción esquemática de la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutanol mediante 3-metilbutiraldehído catalizada por una única enzima de acuerdo con la etapa 8 como se ilustra en la Figura 2.
- 20 **Figuras 7a y 7b:** Reacción esquemática de la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA utilizando NAD(P)H, H⁺ o FADH₂ como cofactor.
- Figura 8:** Reacción esquemática de la conversión enzimática de alcohol isoamílico en acetato de isoamilo.
- Figura 9:** Reacción esquemática de la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA.
- 25 **Figura 10:** Reacción esquemática de la conversión enzimática de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en 3-metilglutaconil-CoA.
- Figura 11:** Reacción esquemática de la condensación de acetoacetil-CoA y acetil-CoA en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA.
- 30 **Figura 12:** Se muestra esquemáticamente las maneras posibles para la producción de acetoacetil-CoA a partir de acetil-CoA, es decir, la reacción de la condensación de dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA o la reacción de la condensación de una molécula de acetil-CoA y una molécula de malonil-CoA en acetoacetil-CoA y la liberación concomitante de CO₂.
- Figura 13:** Se muestra la cuantificación de 3-metilbutan-1-ol producido mediante la reducción enzimática de 3-metilbutiril-CoA catalizada por diferentes deshidrogenasas de cadena corta/reductasas (SDR) en presencia de NADPH como cofactor.
- 35

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación, expresión y purificación de enzimas

Síntesis genética, clonación y expresión de proteínas recombinantes

40 Las secuencias de las enzimas estudiadas deducidas de los genomas de organismos diana se generaron mediante concatenación de oligonucleótidos para ajustar el uso de codón de E. coli (los genes se sintetizaron comercialmente por GeneArt®). Se insertó un tramo de 6 codones de histidina después del codón de inicio de metionina para proporcionar un marcador de afinidad para la purificación. Los genes así sintetizados se clonaron en un vector de expresión pET-25b(+) (los vectores fueron construidos por GeneArt®).

45 Las células competentes de E. coli BL21(DE3) (Novagen) se transformaron con estos vectores de acuerdo con un procedimiento de choque térmico convencional. Las células transformadas se cultivaron con agitado (160 rpm) utilizando un medio de autoinducción ZYM-5052 (Studier FW, Prot. Exp. Pur. 41, (2005), 207-234) durante 6 h a 30 °C y se continuó con la expresión proteica a 18 °C durante una noche (aproximadamente 16 h). Las células se recolectaron por centrifugación a 4 °C, 10.000 rpm durante 20 min y los aglomerados se almacenaron a -80 °C.

Purificación y concentración de proteínas

50 Los aglomerados de 500 ml de cultivo celular se descongelaron sobre hielo y se resuspendieron en 15 ml de la solución tampón apropiada pH 7,5 (es decir, 50 mM de fosfato potásico para la reductasa de cadena corta/deshidrogenasa o 50 mM de Tris-HCl para la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA)), que contenía 200 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de imidazol y 1 mM de DTT. Se añadieron veinte microlitros de lysonase (Novagen). Las células se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y luego se devolvieron al hielo durante 20 minutos. Se completó la lisis celular mediante sonicación durante 2 x 15 segundos. Los extractos bacterianos se clarificaron entonces mediante centrifugación a 4 °C, 4000 rpm durante 40 min. Los lisados bacterianos clarificados se cargaron en una columna PROTINO-2000 Ni-TED (Macherey-Nagel) permitiendo la adsorción de las proteínas marcadas con 6-His. Las columnas se lavaron y se eluyeron las enzimas de interés con 6 ml de la solución tampón apropiada respectiva descrita anteriormente, pH 7,5 que contenía 100 mM de NaCl y 250 mM de imidazol. Los eluidos se concentraron entonces,

55

se desalaron en una unidad de filtro Amicon Ultra-4 10 kDa (Millipore) y se resuspendieron las enzimas en tampones compatibles con el ensayo de actividad enzimática corriente abajo. La pureza de las proteínas así purificadas variaba del 60 % al 90 % según se estimó mediante el análisis SDS-PAGE. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante medición directa en UV de 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) o mediante un ensayo de Bradford (BioRad).

Ejemplo 2: Exploración de una colección de deshidrogenasas de cadena corta/reductasas utilizando 3-metilbutiril-CoA como sustrato y NADPH como cofactor

Se creó y ensayó un conjunto de 5 genes codificantes representativos de las deshidrogenasas/reductasas a través de bacterias marinas en cuanto a su capacidad para reducir la 3-metilbutiril-CoA (isovaleril-CoA) en 3-metilbutan-1-ol (alcohol isoamílico). Los genes se sintetizaron, y se produjeron entonces las enzimas correspondientes de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Ejemplo 1**.

Se ensayó el siguiente conjunto de 5 genes:

- La deshidrogenasa de cadena corta/reductasa de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840 (Número de acceso de Uniprot H8W980).
- La deshidrogenasa de cadena corta/reductasa de *Marinobacter manganoxydans* Mnl7-9 (Número de acceso de Uniprot G6YQS9).
- La deshidrogenasa de cadena corta/reductasa de *Marinobacter* sp. ELB17 (Número de acceso de Uniprot A3JCC5).
- La deshidrogenasa de cadena corta/reductasa de *Marinobacter algicola*. DG893 (Número de acceso de Uniprot A6EUH6).
- La proteína tipo alcohol de cadena corta deshidrogenasa de *Hahella chejuensis* cepa KCTC 2396 (Número de acceso de Uniprot Q2SCE0).

Para los ensayos de reductasa, se utilizó una mezcla de reacción que contenía 50 mM de tampón de fosfato potásico pH 7,5, 20 mM de NADPH, 100 mM de NaCl, 5 mM de 3-metilbutiril-CoA y 0,5 mg/ml de enzima en un volumen total de 150 μ l y se llevaron a cabo las reacciones a 37 °C durante 18 h. De acuerdo con el siguiente protocolo, se llevaron a cabo reacciones de control en las que a) no se añadió ninguna enzima, b) no se añadió sustrato, c) no se añadió cofactor.

Las reacciones se pararon añadiendo 50 μ l de acetonitrilo en el medio de reacción. Las muestras se centrifugaron entonces, se filtraron a través de un filtro de 0,22 μ m y los sobrenadantes clarificados se transfirieron a un vial limpio para el análisis de HPLC. Se utilizaron 3-metilbutiraldehído y 3-metilbutan-1-ol (Sigma-Aldrich) como referencia.

Se llevó a cabo el análisis de HPLC utilizando un Sistema 1260 Infinity LC (Agilent), equipado con un módulo de calentamiento de la columna y un detector refractométrico.

Se separaron 5 μ l de cada muestra en una columna Hi-Plex H (Agilent) (50 x 7,5 mm, tamaño de partícula 8 μ m, temp. De columna 30 °C) con una velocidad de caudal de la fase móvil de 1 ml/min. La fase móvil consistía en 8,4 mM de ácido sulfúrico en agua. El tiempo de retención del 3-metilbutan-1-ol en estas condiciones era de 6,85 min.

Los resultados del análisis de la HPLC para cada ensayo enzimático se resumen en la **Figura 13**.

No se observó producción de 3-metilbutan-1-ol en los ensayos de control. Se observó una producción significativa de 3-metilbutan-1-ol a partir de 3-metilbutiril-CoA en los ensayos enzimáticos. Por lo tanto, las enzimas diana eran capaces de catalizar esta conversión.

Ejemplo 3: Reducción de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído catalizada por una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) utilizando NADH como cofactor

Se sintetizaron los genes de la propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) de *Salmonella typhimurium* (Número de acceso de Uniprot H9L4I6) y *Klebsiella pneumoniae* (Número de acceso de Uniprot A6TDE3) y se produjeron las enzimas correspondientes de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Ejemplo 1**.

Para los ensayos de reductasa, se utilizó una mezcla de reacción típica que contenía 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 20 mM de NADH, 100 mM de NaCl, 5 mM de 3-metilbutiril-CoA y 0,5 -1 mg/ml de enzima en un volumen total de 200 μ l y las reacciones se llevaron a cabo a 37 °C durante 1 h. Se llevaron a cabo controles en paralelo, de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Ejemplo 2**.

Las reacciones se pararon añadiendo 50 μ l de acetonitrilo en el medio de reacción. Las muestras se centrifugaron entonces, se filtraron a través de un filtro de 0,22 μ m y los sobrenadantes clarificados se transfirieron a un vial limpio para el análisis de HPLC. Se llevaron a cabo los análisis de HPLC de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Ejemplo 2**.

ES 2 749 911 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Global Bioenergies

<120> Procedimiento para la producción de alcohol isoamílico

<130> X3873 PCT S3

<150> EP 15 17 4104.8

<151> 26-06-2015

<160> 13

<170> BiSSAP 1.2

<212> PRT

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (cepa ATCC 700491 / DSM 11845 / VT8)

<400> 1

```

Met Asn Tyr Phe Leu Thr Gly Gly Thr Gly Phe Ile Gly Arg Phe Leu
1          5          10          15
Val Glu Lys Leu Leu Ala Arg Gly Gly Thr Val Tyr Val Leu Val Arg
20          25          30
Glu Gln Ser Gln Asp Lys Leu Glu Arg Leu Arg Glu Arg Trp Gly Ala
35          40          45
Asp Asp Lys Gln Val Lys Ala Val Ile Gly Asp Leu Thr Ser Lys Asn
50          55          60
Leu Gly Ile Asp Ala Lys Thr Leu Lys Ser Leu Lys Gly Asn Ile Asp
65          70          75          80
His Val Phe His Leu Ala Ala Val Tyr Asp Met Gly Ala Asp Glu Glu
85          90          95
Ala Gln Ala Ala Thr Asn Ile Glu Gly Thr Arg Ala Ala Val Gln Ala
100         105         110
Ala Glu Ala Met Gly Ala Lys His Phe His His Val Ser Ser Ile Ala
115         120         125
Ala Ala Gly Leu Phe Lys Gly Ile Phe Arg Glu Asp Met Phe Glu Glu
130         135         140
Ala Glu Lys Leu Asp His Pro Tyr Leu Arg Thr Lys His Glu Ser Glu
145         150         155         160
Lys Val Val Arg Glu Glu Cys Lys Val Pro Phe Arg Ile Tyr Arg Pro
165         170         175
Gly Met Val Ile Gly His Ser Glu Thr Gly Glu Met Asp Lys Val Asp
180         185         190
Gly Pro Tyr Tyr Phe Phe Lys Met Ile Gln Lys Ile Arg His Ala Leu
195         200         205
Pro Gln Trp Val Pro Thr Ile Gly Ile Glu Gly Gly Arg Leu Asn Ile
210         215         220
Val Pro Val Asp Phe Val Val Asp Ala Leu Asp His Ile Ala His Leu
225         230         235         240
Glu Gly Glu Asp Gly Asn Cys Phe His Leu Val Asp Ser Asp Pro Tyr
245         250         255
Lys Val Gly Glu Ile Leu Asn Ile Phe Cys Glu Ala Gly His Ala Pro
260         265         270
Arg Met Gly Met Arg Ile Asp Ser Arg Met Phe Gly Phe Ile Pro Pro
275         280         285
Phe Ile Arg Gln Ser Ile Lys Asn Leu Pro Pro Val Lys Arg Ile Thr
290         295         300
Gly Ala Leu Leu Asp Asp Met Gly Ile Pro Pro Ser Val Met Ser Phe
305         310         315         320

```

ES 2 749 911 T3

Ile Asn Tyr Pro Thr Arg Phe Asp Thr Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu
 325 330 335
 Lys Gly Thr Asp Ile Glu Val Pro Arg Leu Pro Ser Tyr Ala Pro Val
 340 345 350
 Ile Trp Asp Tyr Trp Glu Arg Asn Leu Asp Pro Asp Leu Phe Lys Asp
 355 360 365
 Arg Thr Leu Lys Gly Thr Val Glu Gly Lys Val Cys Val Val Thr Gly
 370 375 380
 Ala Thr Ser Gly Ile Gly Leu Ala Thr Ala Glu Lys Leu Ala Glu Ala
 385 390 395 400
 Gly Ala Ile Leu Val Ile Gly Ala Arg Thr Lys Glu Thr Leu Asp Glu
 405 410 415
 Val Ala Ala Ser Leu Glu Ala Lys Gly Gly Asn Val His Ala Tyr Gln
 420 425 430
 Cys Asp Phe Ser Asp Met Asp Asp Cys Asp Arg Phe Val Lys Thr Val
 435 440 445
 Leu Asp Asn His Gly His Val Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Arg
 450 455 460
 Ser Ile Arg Arg Ser Leu Ala Leu Ser Phe Asp Arg Phe His Asp Phe
 465 470 475 480
 Glu Arg Thr Met Gln Leu Asn Tyr Phe Gly Ser Val Arg Leu Ile Met
 485 490 495
 Gly Phe Ala Pro Ala Met Leu Glu Arg Arg Gly His Val Val Asn
 500 505 510
 Ile Ser Ser Ile Gly Val Leu Thr Asn Ala Pro Arg Phe Ser Ala Tyr
 515 520 525
 Val Ser Ser Lys Ser Ala Leu Asp Ala Phe Ser Arg Cys Ala Ala Ala
 530 535 540
 Glu Trp Ser Asp Arg Asn Val Thr Phe Thr Thr Ile Asn Met Pro Leu
 545 550 555 560
 Val Lys Thr Pro Met Ile Ala Pro Thr Lys Ile Tyr Asp Ser Val Pro
 565 570 575
 Thr Leu Thr Pro Asp Glu Ala Ala Gln Met Val Ala Asp Ala Ile Val
 580 585 590
 Tyr Arg Pro Lys Arg Ile Ala Thr Arg Leu Gly Val Phe Ala Gln Val
 595 600 605
 Leu His Ala Leu Ala Pro Lys Met Gly Glu Ile Ile Met Asn Thr Gly
 610 615 620
 Tyr Arg Met Phe Pro Asp Ser Pro Ala Ala Ala Gly Ser Lys Ser Gly
 625 630 635 640
 Glu Lys Pro Lys Val Ser Thr Glu Gln Val Ala Phe Ala Ala Ile Met
 645 650 655
 Arg Gly Ile Tyr Trp
 660

<210> 2

<211> 661

<212> PRT

5 <213> *Marinobacter manganoydans* Mnl7-9

<400> 2

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

ES 2 749 911 T3

				85					90				95		
Ala	Gln	Gln	Ala	Thr	Asn	Ile	Glu	Gly	Thr	Arg	Ala	Ala	Val	Asn	Ala
			100					105					110		
Ala	Glu	Ala	Met	Gly	Ala	Lys	His	Phe	His	His	Val	Ser	Ser	Ile	Ala
		115					120					125			
Ala	Ala	Gly	Leu	Phe	Lys	Gly	Ile	Phe	Arg	Glu	Asp	Met	Phe	Glu	Glu
		130				135					140				
Ala	Glu	Lys	Leu	Asp	His	Pro	Tyr	Leu	Arg	Thr	Lys	His	Glu	Ser	Glu
145					150					155					160
Lys	Val	Val	Arg	Glu	Glu	Cys	Lys	Val	Pro	Phe	Arg	Ile	Tyr	Arg	Pro
				165					170					175	
Gly	Met	Val	Ile	Gly	His	Thr	Ala	Thr	Gly	Glu	Met	Asp	Lys	Val	Asp
		180						185					190		
Gly	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Phe	Lys	Met	Ile	Gln	Lys	Ile	Arg	His	Ala	Leu
		195					200					205			
Pro	Gln	Trp	Val	Pro	Thr	Ile	Gly	Val	Glu	Gly	Gly	Arg	Leu	Asn	Ile
		210				215					220				
Val	Pro	Val	Asp	Phe	Val	Val	Asn	Ala	Met	Asp	His	Ile	Ala	His	Leu
225					230					235					240
Glu	Gly	Glu	Asp	Gly	Lys	Cys	Phe	His	Leu	Val	Asp	Thr	Asp	Pro	Tyr
				245				250					255		
Lys	Val	Gly	Glu	Ile	Leu	Asn	Ile	Phe	Ser	Glu	Ala	Gly	His	Ala	Pro
			260					265					270		
Arg	Met	Gly	Met	Arg	Ile	Asp	Ser	Arg	Met	Phe	Gly	Phe	Ile	Pro	Pro
		275					280					285			
Phe	Ile	Arg	Gln	Ser	Leu	Lys	Asn	Leu	Pro	Pro	Val	Lys	Arg	Leu	Thr
		290				295					300				
Ser	Ala	Ile	Leu	Asp	Asp	Met	Gly	Ile	Pro	Pro	Ser	Val	Met	Ser	Phe
305					310					315					320
Ile	Asn	Tyr	Pro	Thr	Arg	Phe	Asp	Ala	Arg	Glu	Thr	Glu	Arg	Val	Leu
				325					330					335	
Lys	Gly	Thr	Gly	Ile	Glu	Val	Pro	Arg	Leu	Pro	Asp	Tyr	Ala	Pro	Val
			340					345					350		
Ile	Trp	Asp	Tyr	Trp	Glu	Arg	Asn	Leu	Asp	Pro	Asp	Leu	Phe	Lys	Asp
		355					360					365			
Arg	Thr	Leu	Lys	Gly	Thr	Val	Glu	Gly	Arg	Val	Cys	Val	Val	Thr	Gly
		370				375					380				
Ala	Thr	Ser	Gly	Ile	Gly	Leu	Ala	Thr	Ala	Gln	Lys	Leu	Ala	Asp	Ala
385					390					395					400
Gly	Ala	Ile	Leu	Val	Ile	Gly	Ala	Arg	Lys	Leu	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu
				405					410					415	
Val	Ala	Ala	Glu	Leu	Glu	Ser	Arg	Gly	Ala	Ser	Val	His	Ala	Tyr	Pro
			420					425					430		
Cys	Asp	Phe	Ser	Asp	Met	Asp	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Val	Lys	Thr	Val
		435					440					445			
Leu	Asp	Asn	His	Gly	Gln	Val	Asp	Val	Leu	Val	Asn	Asn	Ala	Gly	Arg
450						455					460				
Ser	Ile	Arg	Arg	Ser	Leu	Asp	Leu	Ser	Phe	Asp	Arg	Phe	His	Asp	Phe
465					470					475					480
Glu	Arg	Thr	Met	Gln	Leu	Asn	Tyr	Phe	Gly	Ser	Val	Arg	Leu	Ile	Met
				485					490					495	
Gly	Phe	Ala	Pro	Lys	Met	Leu	Glu	Asn	Arg	Arg	Gly	His	Val	Val	Asn
			500					505					510		
Ile	Ser	Ser	Ile	Gly	Val	Leu	Thr	Asn	Ala	Pro	Arg	Phe	Ser	Ala	Tyr
			515				520					525			
Val	Ala	Ser	Lys	Ser	Ala	Leu	Asp	Ala	Phe	Ser	Arg	Cys	Ala	Ala	Ser
			530			535					540				
Glu	Trp	Ser	Asp	Arg	Asn	Val	Thr	Phe	Thr	Thr	Ile	Asn	Met	Pro	Leu
545					550					555					560
Val	Lys	Thr	Pro	Met	Ile	Ala	Pro	Thr	Lys	Ile	Tyr	Asp	Ser	Val	Pro
				565					570					575	
Thr	Leu	Thr	Pro	Asp	Glu	Ala	Ala	Thr	Met	Val	Ala	Asp	Ala	Ile	Val
				580				585						590	

ES 2 749 911 T3

```

Tyr Arg Pro Lys Arg Ile Ala Thr Arg Leu Gly Ile Phe Ala Gln Val
    595                                600                605
Leu His Ala Leu Ala Pro Lys Met Ala Glu Ile Val Met Asn Thr Gly
    610                                615                620
Tyr Arg Met Phe Pro Asp Ser Pro Ala Ala Ala Gly Ser Arg Ser Gly
    625                                630                635                640
Glu Lys Pro Lys Val Ser Ser Glu Gln Val Ala Phe Ala Ala Ile Met
    645                                650                655
Arg Gly Ile Tyr Trp
    660

```

<210> 3
 <211> 661
 <212> PRT
 5 <213> *Marinobacter* sp. ELB17
 <400> 3

ES 2 749 911 T3

Met Asn Tyr Phe Val Thr Gly Gly Thr Gly Phe Ile Gly Arg Phe Leu
1 5 10 15
Ile Ala Arg Leu Leu Ala Arg Gly Ala Ile Val His Val Leu Val Arg
20 25 30
Glu Gln Ser Val Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Glu Lys Leu Gly Ala
35 40 45
Asp Glu Lys Gln Ile Lys Ala Val Val Gly Asp Leu Thr Ala Pro Gly
50 55 60
Leu Gly Leu Asp Lys Lys Thr Leu Lys Gln Leu Ser Gly Lys Ile Asp
65 70 75 80
His Phe Phe His Leu Ala Ala Ile Tyr Asp Met Ser Ala Ser Glu Glu
85 90 95
Ser Gln Gln Ala Ala Asn Ile Asp Gly Thr Arg Ala Ala Val Ala Ala
100 105 110
Ala Glu Ala Leu Gly Ala Gly Ile Phe His His Val Ser Ile Ala
115 120 125
Val Ala Gly Leu Phe Lys Gly Thr Phe Arg Glu Asp Met Phe Ala Glu
130 135 140
Ala Gly Lys Leu Asp His Pro Tyr Phe Ser Thr Lys His Glu Ser Glu
145 150 155 160
Arg Val Val Arg Asp Glu Cys Lys Leu Pro Phe Arg Ile Tyr Arg Pro
165 170 175
Gly Met Val Ile Gly Asp Ser Ala Thr Gly Glu Met Asp Lys Val Asp
180 185 190
Gly Pro Tyr Tyr Phe Phe Lys Met Ile Gln Lys Ile Arg Gly Ala Leu
195 200 205
Pro Gln Trp Val Pro Thr Ile Gly Leu Glu Gly Gly Arg Leu Asn Ile
210 215 220
Val Pro Val Asn Phe Val Ala Asp Ala Leu Asp His Ile Ala His Leu
225 230 235 240
Pro Asp Glu Asp Gly Lys Cys Phe His Leu Val Asp Ser Asp Pro Tyr
245 250 255
Lys Val Gly Glu Ile Leu Asn Ile Phe Cys Glu Ala Gly His Ala Pro
260 265 270
Lys Met Gly Met Arg Ile Asp Ser Arg Met Phe Gly Phe Val Pro Pro
275 280 285
Phe Ile Arg Gln Ser Leu Lys Asn Leu Pro Pro Val Lys Arg Met Gly
290 295 300
Arg Ala Leu Leu Asp Asp Leu Gly Ile Pro Ala Ser Val Leu Ser Phe
305 310 315 320
Ile Asn Tyr Pro Thr Arg Phe Asp Ala Arg Glu Thr Glu Arg Val Leu
325 330 335
Gln Gly Thr Gly Ile Glu Val Pro Arg Leu Pro Asp Tyr Ala Pro Val
340 345 350
Ile Trp Asp Tyr Trp Glu Arg Asn Leu Asp Pro Asp Leu Phe Thr Asp

ES 2 749 911 T3

```

          355                360                365
Arg Thr Leu Arg Gly Thr Val Glu Gly Lys Val Cys Val Val Thr Gly
   370                375                380
Ala Thr Ser Gly Ile Gly Leu Ala Thr Ala Glu Lys Leu Ala Asp Ala
385                390                395                400
Gly Ala Ile Leu Val Ile Gly Ala Arg Thr Gln Glu Thr Leu Asp Gln
          405                410                415
Val Ser Ala Gln Leu Asn Ala Arg Gly Ala Asp Val His Ala Tyr Gln
          420                425                430
Cys Asp Phe Ala Asp Met Asp Ala Cys Asp Arg Phe Ile Gln Thr Val
          435                440                445
Ser Glu Asn His Gly Ala Val Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Arg
          450                455                460
Ser Ile Arg Arg Ser Leu Asp Lys Ser Phe Asp Arg Phe His Asp Phe
465                470                475                480
Glu Arg Thr Met Gln Leu Asn Tyr Phe Gly Ser Leu Arg Leu Ile Met
          485                490                495
Gly Phe Ala Pro Ala Met Leu Glu Arg Arg Gly His Ile Ile Asn
          500                505                510
Ile Ser Ser Ile Gly Val Leu Thr Asn Ala Pro Arg Phe Ser Ala Tyr
          515                520                525
Val Ala Ser Lys Ala Ala Leu Asp Ser Phe Ser Arg Cys Ala Ala Ala
          530                535                540
Glu Trp Ser Asp Arg His Val Cys Phe Thr Thr Ile Asn Met Pro Leu
545                550                555                560
Val Lys Thr Pro Met Ile Ala Pro Thr Lys Ile Tyr Asp Ser Val Pro
          565                570                575
Thr Leu Ser Pro Glu Glu Ala Ala Asp Met Val Val Asn Ala Ile Val
          580                585                590
Tyr Arg Pro Lys Arg Ile Ala Thr Arg Met Gly Val Phe Ala Gln Val
          595                600                605
Leu Asn Ala Val Ala Pro Lys Ala Ser Glu Ile Leu Met Asn Thr Gly
          610                615                620
Tyr Lys Met Phe Pro Asp Ser Met Pro Lys Lys Gly Lys Glu Val Ser
625                630                635                640
Ala Glu Lys Gly Ala Ser Thr Asp Gln Val Ala Phe Ala Ala Ile Met
          645                650                655
Arg Gly Ile His Trp
          660

```

<210> 4
 <211> 661
 <212> PRT
 <213> *Marinobacter algicola* DG893

5

<400> 4

```

Met Asn Tyr Phe Leu Thr Gly Gly Thr Gly Phe Ile Gly Arg Phe Leu
1          5          10          15
Val Glu Lys Leu Leu Ala Arg Gly Gly Thr Val His Val Leu Val Arg
          20          25          30
Glu Gln Ser Gln Glu Lys Leu Asp Lys Leu Arg Glu Arg Trp Gly Ala
          35          40          45
Asp Glu Ser Arg Val Lys Ala Val Ile Gly Asp Leu Thr Ser Pro Asn
          50          55          60
Leu Gly Ile Asp Ala Lys Thr Met Lys Ser Leu Lys Gly Asn Ile Asp
65          70          75          80
His Phe Phe His Leu Ala Ala Val Tyr Asp Met Gly Ala Asp Glu Lys
          85          90          95
Ser Gln Gln Ala Thr Asn Ile Glu Gly Thr His Ser Ala Val Asn Ala
          100         105         110
Ala Ala Ala Met Glu Ala Gly Cys Phe His His Val Ser Ser Ile Ala
          115         120         125

```

ES 2 749 911 T3

Ala Ala Gly Leu Phe Lys Gly Thr Phe Arg Glu Asp Met Phe Glu Glu
130 135 140
Ala Glu Lys Leu Asp His Pro Tyr Leu Leu Thr Lys His Glu Ser Glu
145 150 155 160
Lys Val Val Arg Glu Ser Cys Lys Val Pro Phe Arg Ile Tyr Arg Pro
165 170 175
Gly Met Val Val Gly His Ser Lys Thr Gly Glu Met Asp Lys Val Asp
180 185 190
Gly Pro Tyr Tyr Phe Phe Lys Met Ile Gln Lys Ile Arg His Ala Leu
195 200 205
Pro Gln Trp Val Pro Thr Ile Gly Ile Glu Gly Gly Arg Leu Asn Ile
210 215 220
Val Pro Val Asp Phe Val Val Asn Ala Met Asp His Ile Ala His Leu
225 230 235 240
Lys Gly Glu Asp Gly Asn Cys Phe His Leu Val Asp Ser Asp Pro Tyr
245 250 255
Lys Val Gly Glu Ile Leu Asn Ile Phe Ser Glu Ala Gly His Ala Pro
260 265 270
Arg Met Ala Met Arg Ile Asp Ser Arg Met Phe Gly Phe Val Pro Pro
275 280 285
Phe Ile Arg Gln Ser Leu Lys Asn Leu Pro Pro Val Lys Arg Leu Thr
290 295 300
Thr Ala Leu Leu Asp Asp Met Gly Ile Pro Pro Ser Val Leu Ser Phe
305 310 315 320
Ile Asn Tyr Pro Thr Arg Phe Asp Ala Arg Glu Thr Glu Arg Val Leu
325 330 335
Lys Asp Thr Gly Ile Val Val Pro Arg Leu Glu Ser Tyr Ala Ala Val
340 345 350
Leu Trp Asp Phe Trp Glu Arg Asn Leu Asp Pro Asp Leu Phe Lys Asp
355 360 365
Arg Thr Leu Arg Gly Thr Val Glu Gly Lys Val Cys Val Ile Thr Gly
370 375 380
Gly Thr Ser Gly Ile Gly Leu Ala Thr Ala Gln Lys Leu Ala Asp Ala
385 390 395 400
Gly Ala Ile Leu Val Ile Gly Ala Arg Lys Lys Glu Arg Leu Met Glu
405 410 415
Val Ala Ala Glu Leu Glu Ala Arg Gly Gly Asn Val His Ala Tyr Gln
420 425 430
Cys Asp Phe Ala Asp Met Asp Asp Cys Asp Arg Phe Val Lys Thr Val
435 440 445
Leu Asp Asn His Gly His Val Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Arg
450 455 460
Ser Ile Arg Arg Ser Leu Ala Leu Ser Phe Asp Arg Phe His Asp Phe
465 470 475 480
Glu Arg Thr Met Gln Leu Asn Tyr Phe Gly Ser Val Arg Leu Ile Met
485 490 495
Gly Phe Ala Pro Ala Met Leu Glu Arg Arg Gly His Val Val Asn
500 505 510
Ile Ser Ser Ile Gly Val Leu Thr Asn Ala Pro Arg Phe Ser Ala Tyr
515 520 525
Val Ala Ser Lys Ser Ala Leu Asp Thr Phe Ser Arg Cys Ala Ala Ala
530 535 540
Glu Trp Ser Asp Arg Asn Val Thr Phe Thr Thr Ile Asn Met Pro Leu
545 550 555 560
Val Lys Thr Pro Met Ile Ala Pro Thr Lys Ile Tyr Asp Ser Val Pro
565 570 575
Thr Leu Thr Pro Asp Glu Ala Ala Glu Met Val Ala Asp Ala Ile Val
580 585 590
Tyr Arg Pro Lys Arg Ile Ala Thr Arg Leu Gly Ile Phe Ala Gln Val
595 600 605
Met Gln Ala Leu Ala Pro Lys Met Gly Glu Ile Val Met Asn Thr Gly
610 615 620
Tyr Arg Met Phe Pro Asp Ser Pro Ala Ala Ala Gly Ser Arg Ser Gly

<400> 6

```

Met Pro Glu Phe Lys Val Asp Ala Arg Gly Pro Ile Glu Ile Trp Thr
1          5          10          15
Ile Asp Gly Glu Ser Arg Arg Asn Ala Ile Ser Arg Ala Met Leu Gln
          20          25          30
Glu Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Val Ser Ser Ser Arg Glu Val Arg
          35          40          45
Ala Val Val Ile Thr Gly Ala Gly Asp Lys Ala Phe Cys Ala Gly Ala
          50          55          60
Asp Leu Lys Glu Arg Ala Thr Met Ala Glu Asp Glu Val Arg Ala Phe
65          70          75          80
Leu Asp Gly Leu Arg Arg Thr Phe Arg Ala Leu Glu Lys Ser Asp Cys
          85          90          95
Val Phe Ile Ala Ala Ile Asn Gly Ala Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu
          100          105          110
Leu Ala Leu Ala Cys Asp Leu Arg Val Ala Ala Pro Ala Ala Glu Leu
115          120          125
Gly Leu Thr Glu Val Lys Leu Gly Ile Ile Pro Gly Gly Gly Gly Thr
130          135          140
Gln Arg Leu Thr Arg Leu Val Gly Pro Gly Arg Ala Lys Asp Leu Ile
145          150          155          160
Leu Thr Ala Arg Arg Ile Asn Ala Ala Glu Ala Phe Ser Val Gly Leu
          165          170          175
Val Asn Arg Leu Ala Pro Glu Gly His Leu Leu Ala Val Ala Tyr Gly
180          185          190
Leu Ala Glu Ser Val Val Glu Asn Ala Pro Ile Ala Val Ala Thr Ala
195          200          205
Lys His Ala Ile Asp Glu Gly Thr Gly Leu Glu Leu Asp Asp Ala Leu
210          215          220
Ala Leu Glu Leu Arg Lys Tyr Glu Glu Ile Leu Lys Thr Glu Asp Arg
225          230          235          240
Leu Glu Gly Leu Arg Ala Phe Ala Glu Lys Arg Ala Pro Val Tyr Lys
          245          250          255
Gly Arg

```

<210> 7

<211> 447

5 <212> PRT

<213> *Schizosaccharomyces pombe* (cepa 972 / ATCC 24843)

<400> 7

ES 2 749 911 T3

```

Met Ser Phe Asp Arg Lys Asp Ile Gly Ile Lys Gly Leu Val Leu Tyr
1      5      10
Thr Pro Asn Gln Tyr Val Glu Gln Ala Ala Leu Glu Ala His Asp Gly
      20      25      30
Val Ser Thr Gly Lys Tyr Thr Ile Gly Leu Gly Leu Thr Lys Met Ala
      35      40      45
Phe Val Asp Asp Arg Glu Asp Ile Tyr Ser Phe Gly Leu Thr Ala Leu
      50      55      60
Ser Gln Leu Ile Lys Arg Tyr Gln Ile Asp Ile Ser Lys Ile Gly Arg
65      70      75      80
Leu Glu Val Gly Thr Glu Thr Ile Ile Asp Lys Ser Lys Ser Val Lys
      85      90      95
Ser Val Leu Met Gln Leu Phe Gly Asp Asn His Asn Val Glu Gly Ile
      100      105      110
Asp Cys Val Asn Ala Cys Tyr Gly Gly Val Asn Ala Leu Phe Asn Thr
      115      120      125
Ile Asp Trp Ile Glu Ser Ser Ala Trp Asp Gly Arg Asp Gly Ile Val
130      135      140
Val Ala Gly Asp Ile Ala Leu Tyr Ala Lys Gly Asn Ala Arg Pro Thr

145      150      155      160
Gly Gly Ala Gly Cys Val Ala Leu Leu Val Gly Pro Asn Ala Pro Ile
      165      170      175
Val Phe Glu Pro Gly Leu Arg Gly Thr Tyr Met Gln His Ala Tyr Asp
      180      185      190
Phe Tyr Lys Pro Asp Leu Thr Ser Glu Tyr Pro Tyr Val Asp Gly His
      195      200      205
Phe Ser Leu Glu Cys Tyr Val Lys Ala Leu Asp Gly Ala Tyr Ala Asn
210      215      220
Tyr Asn Val Arg Asp Val Ala Lys Asn Gly Lys Ser Gln Gly Leu Gly
225      230      235      240
Leu Asp Arg Phe Asp Tyr Cys Ile Phe His Ala Pro Thr Cys Lys Gln
      245      250      255
Val Gln Lys Ala Tyr Ala Arg Leu Leu Tyr Thr Asp Ser Ala Ala Glu
      260      265      270
Pro Ser Asn Pro Glu Leu Glu Gly Val Arg Glu Leu Leu Ser Thr Leu
      275      280      285
Asp Ala Lys Lys Ser Leu Thr Asp Lys Ala Leu Glu Lys Gly Leu Met
290      295      300
Ala Ile Thr Lys Glu Arg Phe Asn Lys Arg Val Ser Pro Ser Val Tyr
305      310      315      320
Ala Pro Thr Asn Cys Gly Asn Met Tyr Thr Ala Ser Ile Phe Ser Cys
      325      330      335
Leu Thr Ala Leu Leu Ser Arg Val Pro Ala Asp Glu Leu Lys Gly Lys
      340      345      350
Arg Val Gly Ala Tyr Ser Tyr Gly Ser Gly Leu Ala Ala Ser Phe Phe
      355      360      365
Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Val Ser Glu Ile Ala Lys Lys Thr Asn
370      375      380
Leu Val Asn Asp Leu Asp Asn Arg His Cys Leu Thr Pro Thr Gln Tyr
385      390      395      400
Glu Glu Ala Ile Glu Leu Arg His Gln Ala His Leu Lys Lys Asn Phe
      405      410      415
Thr Pro Lys Gly Ser Ile Glu Arg Leu Arg Ser Gly Thr Tyr Tyr Leu
      420      425      430
Thr Gly Ile Asp Asp Met Phe Arg Arg Ser Tyr Ser Val Lys Pro
      435      440      445

```

<210> 8
 <211> 392
 <212> PRT

ES 2 749 911 T3

<213> *Clostridium acetobutylicum* (cepa ATCC 824 / DSM 792 / JCM 1419 / LMG 5710 / VKM B-1787)

<400> 8

```

Met Lys Glu Val Val Ile Ala Ser Ala Val Arg Thr Ala Ile Gly Ser
1      5      10
Tyr Gly Lys Ser Leu Lys Asp Val Pro Ala Val Asp Leu Gly Ala Thr
      20      25      30
Ala Ile Lys Glu Ala Val Lys Lys Ala Gly Ile Lys Pro Glu Asp Val
      35      40      45
Asn Glu Val Ile Leu Gly Asn Val Leu Gln Ala Gly Leu Gly Gln Asn
      50      55      60
Pro Ala Arg Gln Ala Ser Phe Lys Ala Gly Leu Pro Val Glu Ile Pro
65      70      75      80
Ala Met Thr Ile Asn Lys Val Cys Gly Ser Gly Leu Arg Thr Val Ser
      85      90      95
Leu Ala Ala Gln Ile Ile Lys Ala Gly Asp Ala Asp Val Ile Ile Ala
      100      105      110
Gly Gly Met Glu Asn Met Ser Arg Ala Pro Tyr Leu Ala Asn Asn Ala
      115      120      125
Arg Trp Gly Tyr Arg Met Gly Asn Ala Lys Phe Val Asp Glu Met Ile

      130      135      140
Thr Asp Gly Leu Trp Asp Ala Phe Asn Asp Tyr His Met Gly Ile Thr
145      150      155      160
Ala Glu Asn Ile Ala Glu Arg Trp Asn Ile Ser Arg Glu Glu Gln Asp
      165      170      175
Glu Phe Ala Leu Ala Ser Gln Lys Lys Ala Glu Glu Ala Ile Lys Ser
      180      185      190
Gly Gln Phe Lys Asp Glu Ile Val Pro Val Val Ile Lys Gly Arg Lys
      195      200      205
Gly Glu Thr Val Val Asp Thr Asp Glu His Pro Arg Phe Gly Ser Thr
210      215      220
Ile Glu Gly Leu Ala Lys Leu Lys Pro Ala Phe Lys Lys Asp Gly Thr
225      230      235      240
Val Thr Ala Gly Asn Ala Ser Gly Leu Asn Asp Cys Ala Ala Val Leu
      245      250      255
Val Ile Met Ser Ala Glu Lys Ala Lys Glu Leu Gly Val Lys Pro Leu
260      265      270
Ala Lys Ile Val Ser Tyr Gly Ser Ala Gly Val Asp Pro Ala Ile Met
275      280      285
Gly Tyr Gly Pro Phe Tyr Ala Thr Lys Ala Ala Ile Glu Lys Ala Gly
290      295      300
Trp Thr Val Asp Glu Leu Asp Leu Ile Glu Ser Asn Glu Ala Phe Ala
305      310      315      320
Ala Gln Ser Leu Ala Val Ala Lys Asp Leu Lys Phe Asp Met Asn Lys
      325      330      335
Val Asn Val Asn Gly Gly Ala Ile Ala Leu Gly His Pro Ile Gly Ala
340      345      350
Ser Gly Ala Arg Ile Leu Val Thr Leu Val His Ala Met Gln Lys Arg
355      360      365
Asp Ala Lys Lys Gly Leu Ala Thr Leu Cys Ile Gly Gly Gly Gln Gly
370      375      380
Thr Ala Ile Leu Leu Glu Lys Cys
385      390

```

<210> 9

5 <211> 462

<212> PRT

<213> *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*

<400> 9

ES 2 749 911 T3

Met Asn Thr Ala Glu Leu Glu Thr Leu Ile Arg Thr Ile Leu Ser Glu
1 5 10 15
Lys Leu Ala Pro Thr Pro Pro Ala Pro Gln Gln Glu Gln Gly Ile Phe
20 25 30
Cys Asp Val Gly Ser Ala Ile Asp Ala Ala His Gln Ala Phe Leu Arg
35 40 45
Tyr Gln Gln Cys Pro Leu Lys Thr Arg Ser Ala Ile Ile Ser Ala Leu
50 55 60
Arg Glu Thr Leu Ala Pro Glu Leu Ala Thr Leu Ala Glu Glu Ser Ala
65 70 75 80
Thr Glu Thr Gly Met Gly Asn Lys Glu Asp Lys Tyr Leu Lys Asn Lys
85 90 95
Ala Ala Leu Glu Asn Thr Pro Gly Ile Glu Asp Leu Thr Thr Ser Ala
100 105 110
Leu Thr Gly Asp Gly Gly Met Val Leu Phe Glu Tyr Ser Pro Phe Gly
115 120 125
Val Ile Gly Ala Val Ala Pro Ser Thr Asn Pro Thr Glu Thr Ile Ile
130 135 140
Asn Asn Ser Ile Ser Met Leu Ala Ala Gly Asn Ser Val Tyr Phe Ser
145 150 155 160
Pro His Pro Gly Ala Lys Lys Val Ser Leu Lys Leu Ile Ala Arg Ile
165 170 175

Glu Glu Ile Ala Tyr Arg Cys Ser Gly Ile Arg Asn Leu Val Val Thr
180 185 190
Val Ala Glu Pro Thr Phe Glu Ala Thr Gln Gln Met Met Ser His Pro
195 200 205
Leu Ile Ala Val Leu Ala Ile Thr Gly Gly Pro Gly Ile Val Ala Met
210 215 220
Gly Met Lys Ser Gly Lys Lys Val Ile Gly Ala Gly Ala Gly Asn Pro
225 230 235 240
Pro Cys Ile Val Asp Glu Thr Ala Asp Leu Val Lys Ala Ala Glu Asp
245 250 255
Ile Ile Ser Gly Ala Ala Phe Asp Tyr Asn Leu Pro Cys Ile Ala Glu
260 265 270
Lys Ser Leu Ile Val Val Ala Ser Val Ala Asp Arg Leu Ile Gln Gln
275 280 285
Met Gln Asp Phe Asp Ala Leu Leu Leu Ser Arg Gln Glu Ala Asp Thr
290 295 300
Leu Arg Ala Val Cys Leu Pro Asp Gly Ala Ala Asn Lys Lys Leu Val
305 310 315 320
Gly Lys Ser Pro Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ala Gly Leu Ala Val Pro
325 330 335
Pro Arg Pro Pro Arg Leu Leu Ile Ala Glu Val Glu Ala Asn Asp Pro
340 345 350
Trp Val Thr Cys Glu Gln Leu Met Pro Val Leu Pro Ile Val Arg Val
355 360 365
Ala Asp Phe Asp Ser Ala Leu Ala Leu Ala Leu Arg Val Glu Glu Gly
370 375 380
Leu His His Thr Ala Ile Met His Ser Gln Asn Val Ser Arg Leu Asn
385 390 395 400
Leu Ala Ala Arg Thr Leu Gln Thr Ser Ile Phe Val Lys Asn Gly Pro
405 410 415
Ser Tyr Ala Gly Ile Gly Val Gly Gly Glu Gly Phe Thr Thr Phe Thr
420 425 430
Ile Ala Thr Pro Thr Gly Glu Gly Thr Thr Ser Ala Arg Thr Phe Ala
435 440 445
Arg Leu Arg Arg Cys Val Leu Thr Asn Gly Phe Ser Ile Arg
450 455 460

<210> 10
<211> 464

ES 2 749 911 T3

<212> PRT

<213> *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*

<400> 10

```

Met Asn Thr Ser Glu Leu Glu Thr Leu Ile Arg Thr Ile Leu Ser Glu
1      5      10      15
Gln Leu Thr Thr Pro Ala Gln Thr Pro Val Gln Pro Gln Gly Lys Gly
20      25      30
Ile Phe Gln Ser Val Ser Glu Ala Ile Asp Ala Ala His Gln Ala Phe
35      40      45
Leu Arg Tyr Gln Gln Cys Pro Leu Lys Thr Arg Ser Ala Ile Ile Ser
50      55      60
Ala Met Arg Gln Glu Leu Thr Pro Leu Leu Ala Pro Leu Ala Glu Glu
65      70      75      80
Ser Ala Asn Glu Thr Gly Met Gly Asn Lys Glu Asp Lys Phe Leu Lys
85      90      95
Asn Lys Ala Ala Leu Asp Asn Thr Pro Gly Val Glu Asp Leu Thr Thr
100
Thr Ala Leu Thr Gly Asp Gly Gly Met Val Leu Phe Glu Tyr Ser Pro
115      120      125
Phe Gly Val Ile Gly Ser Val Ala Pro Ser Thr Asn Pro Thr Glu Thr
130      135      140
Ile Ile Asn Asn Ser Ile Ser Met Leu Ala Ala Gly Asn Ser Ile Tyr

145      150      155      160
Phe Ser Pro His Pro Gly Ala Lys Lys Val Ser Leu Lys Leu Ile Ser
165      170      175
Leu Ile Glu Glu Ile Ala Phe Arg Cys Cys Gly Ile Arg Asn Leu Val
180      185      190
Val Thr Val Ala Glu Pro Thr Phe Glu Ala Thr Gln Gln Met Met Ala
195      200      205
His Pro Arg Ile Ala Val Leu Ala Ile Thr Gly Gly Pro Gly Ile Val
210      215      220
Ala Met Gly Met Lys Ser Gly Lys Lys Val Ile Gly Ala Gly Ala Gly
225      230      235      240
Asn Pro Pro Cys Ile Val Asp Glu Thr Ala Asp Leu Val Lys Ala Ala
245      250      255
Glu Asp Ile Ile Asn Gly Ala Ser Phe Asp Tyr Asn Leu Pro Cys Ile
260      265      270
Ala Glu Lys Ser Leu Ile Val Val Glu Ser Val Ala Glu Arg Leu Val
275      280      285
Gln Gln Met Gln Thr Phe Gly Ala Leu Leu Leu Ser Pro Ala Asp Thr
290      295      300
Asp Lys Leu Arg Ala Val Cys Leu Pro Glu Gly Gln Ala Asn Lys Lys
305      310      315      320
Leu Val Gly Lys Ser Pro Ser Ala Met Leu Glu Ala Ala Gly Ile Ala
325      330      335
Val Pro Ala Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile Ala Leu Val Asn Ala Asp
340      345      350
Asp Pro Trp Val Thr Ser Glu Gln Leu Met Pro Met Leu Pro Val Val
355      360      365
Lys Val Ser Asp Phe Asp Ser Ala Leu Ala Leu Ala Leu Lys Val Glu
370      375      380
Glu Gly Leu His His Thr Ala Ile Met His Ser Gln Asn Val Ser Arg
385      390      395      400
Leu Asn Leu Ala Ala Arg Thr Leu Gln Thr Ser Ile Phe Val Lys Asn
405      410      415
Gly Pro Ser Tyr Ala Gly Ile Gly Val Gly Gly Glu Gly Phe Thr Thr
420      425      430
Phe Thr Ile Ala Thr Pro Thr Gly Glu Gly Thr Thr Ser Ala Arg Thr
435      440      445
Phe Ala Arg Ser Arg Arg Cys Val Leu Thr Asn Gly Phe Ser Ile Arg
450      455      460

```

ES 2 749 911 T3

<210> 11
 <211> 661
 <212> PRT
 <213> *Hallella chejuensis* (cepa KCTC 2396)

5 <400> 11

Met	Asn	Tyr	Phe	Val	Thr	Gly	Gly	Thr	Gly	Phe	Ile	Gly	Arg	Phe	Leu
1				5					10					15	
Val	Pro	Lys	Leu	Leu	Lys	Arg	Gly	Gly	Thr	Val	Tyr	Leu	Leu	Val	Arg
			20					25					30		
Glu	Ala	Ser	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Glu	Arg	Trp	Asn	Ala
		35					40					45			
Ser	Asp	Glu	Gln	Val	Val	Gly	Val	Val	Gly	Asp	Leu	Ala	Gln	Pro	Met
	50					55					60				
Leu	Gly	Val	Ser	Glu	Lys	Asp	Ala	Ala	Met	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Gly
65					70					75					80
His	Phe	Phe	His	Leu	Ala	Ala	Ile	Tyr	Asp	Met	Gln	Ala	Ser	Ala	Glu
				85					90					95	
Ser	Gln	Glu	Gln	Ala	Asn	Ile	Glu	Gly	Thr	Arg	Asn	Ala	Val	Lys	Leu
			100					105					110		

ES 2 749 911 T3

Ala Asp Ser Leu Lys Ala Ala Cys Phe His His Val Ser Ser Ile Ala
115 120 125
Ala Ala Gly Leu Tyr Arg Gly Ile Phe Arg Glu Asp Met Phe Glu Glu
130 135 140
Ala Glu Lys Leu Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Thr Lys His Glu Ser Glu
145 150 155 160
Lys Val Val Arg Glu Glu Cys Gln Thr Pro Trp Arg Val Tyr Arg Pro
165 170 175
Gly Met Val Val Gly His Ser Lys Thr Gly Glu Ile Asp Lys Ile Asp
180 185 190
Gly Pro Tyr Tyr Phe Phe Lys Leu Ile Gln Lys Leu Arg Ser Ala Leu
195 200 205
Pro Gln Trp Met Pro Thr Val Gly Leu Glu Gly Gly Arg Ile Asn Ile
210 215 220
Val Pro Val Asp Phe Val Val Asp Ala Met Asp His Ile Ala His Ala
225 230 235 240
Glu Gly Glu Asp Gly Lys Cys Phe His Leu Thr Asp Pro Asp Pro Tyr
245 250 255
Lys Val Gly Glu Ile Leu Asn Ile Phe Ala Glu Ala Gly His Ala Pro
260 265 270
Lys Met Ala Met Arg Ile Asp Ala Arg Met Phe Gly Phe Ile Pro Pro
275 280 285
Met Ile Arg Gln Gly Ile Ala Arg Leu Pro Pro Val Gln Arg Met Lys
290 295 300
Asn Ala Val Leu Asn Asp Leu Gly Ile Pro Asp Glu Val Met Ser Phe
305 310 315 320
Ile Asn Tyr Pro Thr Arg Phe Asp Asn Arg Glu Thr Glu Arg Leu Leu
325 330 335
Lys Gly Thr Ala Ile Ala Val Pro Arg Leu Gln Asp Tyr Ser Pro Ala
340 345 350
Ile Trp Asp Tyr Trp Glu Arg His Leu Asp Pro Asp Leu His Lys Asp
355 360 365
Arg Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Gly Arg Val Cys Val Ile Thr Gly
370 375 380
Ala Thr Ser Gly Ile Gly Leu Ser Ala Ala Arg Lys Leu Ala Glu Ala
385 390 395 400
Gly Ala Lys Val Val Ile Ala Ala Arg Thr Leu Glu Lys Leu Gln Glu
405 410 415
Val Lys Lys Glu Leu Glu Glu Leu Gly Gly Glu Val Tyr Glu Tyr Ser
420 425 430
Val Asp Leu Ser Asp Leu Glu Asp Cys Asp Arg Phe Val Ala Asn Val
435 440 445
Leu Lys Asp Leu Gly His Val Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Arg
450 455 460
Ser Ile Arg Arg Ser Ile Gln His Ala Phe Asp Arg Phe His Asp Phe
465 470 475 480
Glu Arg Thr Met Gln Leu Asn Tyr Phe Gly Ser Leu Arg Leu Ile Met
485 490 495
Gly Phe Ala Pro Ser Met Leu Glu Arg Arg Arg Gly His Ile Val Asn
500 505 510
Ile Ser Ser Ile Gly Val Leu Thr Asn Ala Pro Arg Phe Ser Ala Tyr
515 520 525
Val Ala Ser Lys Ala Ala Leu Asp Ala Phe Ser Arg Cys Ala Ala Ala
530 535 540
Glu Phe Ser Asp Lys Asn Val Thr Phe Thr Thr Ile Asn Met Pro Leu
545 550 555 560
Val Arg Thr Pro Met Ile Ser Pro Thr Lys Ile Tyr Asp Ser Val Pro
565 570 575
Thr Leu Thr Pro Glu Glu Ala Ala Asp Leu Val Ala Glu Ala Ile Ile
580 585 590
His Arg Pro Lys Arg Ile Ala Thr Arg Leu Gly Val Phe Ala Gln Val
595 600 605
Leu His Ser Met Ala Pro Lys Phe Ser Glu Ile Ile Met Asn Thr Gly

ES 2 749 911 T3

	610				615					620						
	Phe	Lys	Met	Phe	Pro	Asp	Ser	Ser	Ala	Ala	Thr	Gly	Gly	Lys	Asp	Gly
	625					630					635					640
	Glu	Lys	Pro	Lys	Val	Ser	Thr	Glu	Gln	Val	Ala	Phe	Ala	Ala	Ile	Met
					645					650					655	
	Arg	Gly	Ile	His	Trp											
				660												

<210> 12

<211> 418

<212> PRT

5 <213> *Myxococcus xanthus* DK 1622

<400> 12

ES 2 749 911 T3

Met Lys Lys Arg Val Gly Ile Glu Ala Leu Ala Val Ala Val Pro Ser
 1 5 10 15
 Arg Tyr Val Asp Ile Glu Asp Leu Ala Arg Ala Arg Gly Val Asp Pro
 20 25 30
 Ala Lys Tyr Thr Ala Gly Leu Gly Ala Arg Glu Met Ala Val Thr Asp
 35 40 45
 Pro Gly Glu Asp Thr Val Ala Leu Ala Ala Thr Ala Ala Arg Leu
 50 55 60
 Ile Arg Gln Gln Asp Val Asp Pro Ser Arg Ile Gly Met Leu Val Val
 65 70 75 80
 Gly Thr Glu Thr Gly Ile Asp His Ser Lys Pro Val Ala Ser His Val
 85 90 95
 Gln Gly Leu Leu Lys Leu Pro Arg Thr Met Arg Thr Tyr Asp Thr Gln
 100 105 110
 His Ala Cys Tyr Gly Gly Thr Ala Gly Leu Met Ala Ala Val Glu Trp
 115 120 125
 Ile Ala Ser Gly Ala Gly Ala Gly Lys Val Ala Val Val Val Cys Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Arg Tyr Gly Leu Asn Thr Ala Gly Glu Pro Thr Gln Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Ala Val Ala Leu Leu Val Ser Glu Gln Pro Asp Leu Leu Ala
 165 170 175
 Met Asp Val Gly Leu Asn Gly Val Cys Ser Met Asp Val Tyr Asp Phe
 180 185 190
 Trp Arg Pro Val Gly Arg Arg Glu Ala Leu Val Asp Gly His Tyr Ser
 195 200 205
 Ile Thr Cys Tyr Leu Glu Ala Leu Ser Gly Ala Tyr Arg Gly Trp Arg
 210 215 220
 Glu Lys Ala Leu Ala Ala Gly Leu Val Arg Trp Ser Asp Ala Leu Pro
 225 230 235 240
 Gly Glu Gln Leu Ala Arg Ile Ala Tyr His Val Pro Phe Cys Lys Met
 245 250 255
 Ala Arg Lys Ala His Thr Gln Leu Arg Leu Cys Asp Leu Glu Asp Ala
 260 265 270
 Ala Asp Ala Ala Ala Ser Thr Pro Glu Ser Arg Glu Ala Gln Ala Lys
 275 280 285
 Ser Ala Ala Ser Tyr Asp Ala Gln Val Ala Thr Ser Leu Gly Leu Asn
 290 295 300
 Ser Arg Ile Gly Asn Val Tyr Thr Ala Ser Leu Tyr Leu Ala Leu Ala
 305 310 315 320
 Gly Leu Leu Gln His Glu Ala Gly Ala Leu Ala Gly Gln Arg Ile Gly
 325 330 335
 Leu Leu Ser Tyr Gly Ser Gly Cys Ala Ala Glu Phe Tyr Ser Gly Thr
 340 345 350
 Val Gly Glu Lys Ala Ala Glu Arg Met Ala Lys Ala Asp Leu Glu Ala
 355 360 365
 Val Leu Ala Arg Arg Glu Arg Val Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Arg Leu
 370 375 380

 Met Lys Leu Pro Ala Asp Ala Pro Glu Ala Val Ala Pro Ser Pro Gly
 385 390 395 400
 Ala Phe Arg Leu Thr Glu Ile Arg Asp His Arg Arg Gln Tyr Ala Glu
 405 410 415
 Gly Asn

<210> 13
 <211> 660
 <212> PRT

5 <213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840 (Uniprot H8W980)

<220>
 <223> deshidrogenasa de cadena corta/reductasa

ES 2 749 911 T3

<400> 13

Met Asn Tyr Phe Leu Thr Gly Gly Thr Gly Phe Ile Gly Arg Phe Leu
1 5 10 15
Val Glu Lys Leu Leu Ala Arg Gly Gly Thr Val Tyr Val Leu Val Arg
20 25 30
Glu Gln Ser Gln Asp Lys Leu Glu Arg Leu Arg Glu Arg Trp Gly Ala
35 40 45
Asp Asp Lys Gln Val Lys Ala Val Ile Gly Asp Leu Thr Ser Lys Asn
50 55 60
Leu Gly Ile Asp Ala Lys Thr Leu Lys Ser Leu Lys Gly Asn Ile Asp
65 70 75 80
His Val Phe His Leu Ala Ala Val Tyr Asp Met Gly Ala Asp Glu Glu
85 90 95
Ala Gln Ala Ala Thr Asn Ile Glu Gly Thr Arg Ala Ala Val Gln Ala
100 105 110
Ala Glu Ala Met Gly Ala Lys His Phe His His Val Ser Ser Ile Ala
115 120 125
Ala Ala Gly Leu Phe Lys Gly Ile Phe Arg Glu Asp Met Phe Glu Glu
130 135 140
Ala Glu Lys Leu Asp His Pro Tyr Leu Arg Thr Lys His Glu Ser Glu
145 150 155 160
Lys Val Val Arg Glu Glu Cys Lys Val Pro Phe Arg Ile Tyr Arg Pro
165 170 175
Gly Met Val Ile Gly His Ser Glu Thr Gly Glu Met Asp Lys Val Asp
180 185 190
Gly Pro Tyr Tyr Phe Phe Lys Met Ile Gln Lys Ile Arg His Ala Leu
195 200 205
Pro Gln Trp Val Pro Thr Ile Gly Ile Glu Gly Gly Arg Leu Asn Ile
210 215 220
Val Pro Val Asp Phe Val Val Asp Ala Leu Asp His Ile Ala His Leu
225 230 235 240
Glu Gly Glu Asp Gly Asn Cys Phe His Leu Val Asp Ser Asp Pro Tyr
245 250 255
Lys Val Gly Glu Ile Leu Asn Ile Phe Cys Glu Ala Gly His Ala Pro
260 265 270
Arg Met Gly Met Arg Ile Asp Ser Arg Met Phe Gly Phe Ile Pro Pro
275 280 285
Phe Ile Arg Gln Ser Ile Lys Asn Leu Pro Pro Val Lys Arg Ile Thr
290 295 300
Gly Ala Leu Leu Asp Asp Met Gly Ile Pro Pro Ser Val Met Ser Phe
305 310 315 320
Ile Asn Tyr Pro Thr Arg Phe Asp Thr Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu
325 330 335
Lys Gly Thr Asp Ile Glu Val Pro Arg Leu Pro Ser Tyr Ala Pro Val
340 345 350
Ile Trp Asp Tyr Trp Glu Arg Asn Leu Asp Pro Asp Leu Phe Lys Asp
355 360 365
Arg Thr Leu Lys Gly Thr Val Glu Gly Lys Val Cys Val Val Thr Gly

ES 2 749 911 T3

370						375						380					
Ala	Thr	Ser	Gly	Ile	Gly	Leu	Ala	Thr	Ala	Glu	Lys	Leu	Ala	Glu	Ala		
385					390					395					400		
Gly	Ala	Ile	Leu	Val	Ile	Gly	Ala	Arg	Thr	Lys	Glu	Thr	Leu	Asp	Glu		
				405					410					415			
Val	Ala	Ala	Ser	Leu	Glu	Ala	Lys	Gly	Gly	Asn	Val	His	Ala	Tyr	Gln		
				420					425					430			
Cys	Asp	Phe	Ser	Asp	Met	Asp	Asp	Cys	Asp	Arg	Phe	Val	Lys	Thr	Val		
		435					440						445				
Leu	Asp	Asn	His	Gly	His	Val	Asp	Val	Leu	Val	Asn	Asn	Ala	Gly	Arg		
	450					455							460				
Ser	Ile	Arg	Arg	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Phe	Asp	Arg	Phe	His	Asp	Phe		
465					470					475					480		
Glu	Arg	Thr	Met	Gln	Leu	Asn	Tyr	Phe	Gly	Ser	Val	Arg	Leu	Ile	Met		
				485					490					495			
Gly	Phe	Ala	Pro	Ala	Met	Leu	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	His	Val	Val	Asn		
			500					505						510			
Ile	Ser	Ser	Ile	Gly	Val	Leu	Thr	Asn	Ala	Pro	Arg	Phe	Ser	Ala	Tyr		
		515					520						525				
Val	Ala	Ser	Lys	Ser	Ala	Leu	Asp	Ala	Phe	Ser	Arg	Cys	Ala	Ala	Ala		
	530					535						540					
Glu	Trp	Ser	Asp	Arg	Asn	Val	Thr	Phe	Thr	Thr	Ile	Asn	Met	Pro	Leu		
545					550					555					560		
Val	Lys	Thr	Pro	Met	Ile	Ala	Pro	Thr	Lys	Ile	Tyr	Asp	Ser	Val	Pro		
				565					570					575			
Thr	Leu	Thr	Pro	Asp	Glu	Ala	Ala	Gln	Met	Val	Ala	Asp	Ala	Ile	Val		
			580					585						590			
Tyr	Arg	Pro	Lys	Arg	Ile	Ala	Thr	Arg	Leu	Gly	Val	Phe	Ala	Gln	Val		
		595					600						605				
Leu	His	Ala	Leu	Ala	Pro	Lys	Met	Gly	Glu	Ile	Ile	Met	Asn	Thr	Gly		
	610					615						620					
Tyr	Arg	Met	Phe	Pro	Asp	Ser	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly		
625					630					635					640		
Glu	Lys	Pro	Lys	Val	Ser	Thr	Glu	Gln	Val	Ala	Phe	Ala	Ala	Ile	Met		
				645					650					655			
Arg	Gly	Ile	Tyr														
			660														

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de alcohol isoamílico (3-metilbutan-1-ol) que comprende la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico, que comprende:
- (a) dos etapas enzimáticas que comprenden
- 5 (i) primero la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído utilizando una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87); y
- 10 (ii) posteriormente, la conversión enzimática del 3-metilbutiraldehído así obtenido en dicho alcohol isoamílico;
- o
- (b) una única reacción enzimática en la que la 3-metilbutiril-CoA se convierte directamente en alcohol isoamílico utilizando una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84).
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la conversión enzimática de dicho 3-metilbutiraldehído en dicho alcohol isoamílico se consigue utilizando una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH o NADPH como donante.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente la provisión de la 3-metilbutiril-CoA mediante la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en dicha 3-metilbutiril-CoA.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en dicha 3-metilbutiril-CoA se consigue utilizando una enzima que se clasifica como EC 1.3.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la enzima se selecciona de entre el grupo que consiste en
- (i) una acil-CoA deshidrogenasa (NADP+) (EC 1.3.1.8);
- 25 (ii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.10);
- (iii) una cis-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.37);
- (iv) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.38);
- (v) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Re) (EC 1.3.1.39);
- (vi) crotonil-CoA reductasa (EC 1.3.1.86);
- 30 (vii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADH) (EC 1.3.1.9);
- (viii) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD⁺) (EC 1.3.1.44); y
- (ix) una isovaleril-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.8.4).
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente la conversión enzimática del alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo).
- 35 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la conversión enzimática del alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo) se consigue utilizando una alcohol-O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.84).
8. Un procedimiento de producción de 3-metilbutiraldehído que comprende la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído, en el que la conversión enzimática de dicho 3-metilbutiril-CoA en dicho 3-metilbutiraldehído se consigue utilizando una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante (EC 1.2.1.-), en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87).
- 40 9. Un organismo o microorganismo recombinante que expresa
- (i) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de dicha 3-metilbutiril-CoA en dicho 3-metilbutiraldehído es una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87);
- 45 (ii) una enzima capaz de la conversión enzimática del 3-metilbutiraldehído en alcohol isoamílico;
- (iii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA; y
- 50 (iv) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA.
10. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de dicho 3-metilbutiraldehído en dicho alcohol isoamílico es una enzima que se clasifica como

- EC 1.1.1.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con el NADH o NADPH como donante.
11. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de la 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA es una enzima que es una 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.4), geranoil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.5) o una glutaconil-CoA decarboxilasa (EC 4.1.1.70).
12. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de la 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA de acuerdo con (iv) es una enzima que se clasifica como EC 1.3.-.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH.
13. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la enzima se selecciona de entre el grupo que consiste en
- (i) una acil-CoA deshidrogenasa (NADP+) (EC 1.3.1.8);
 - (ii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.10);
 - (iii) una cis-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.37);
 - (iv) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.38);
 - (v) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Re) (EC 1.3.1.39);
 - (vi) crotonil-CoA reductasa (EC 1.3.1.86);
 - (vii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADH) (EC 1.3.1.9);
 - (viii) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD⁺) (EC 1.3.1.44); y
 - (ix) una isovaleril-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.8.4).
14. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 que expresa adicionalmente una enzima capaz de la conversión enzimática del alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo).
15. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo) es una alcohol-O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.84).
16. Un organismo o microorganismo recombinante que expresa
- (i) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84);
 - (ii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA; y
 - (iii) una enzima capaz de la conversión enzimática de 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA.
17. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de dicha 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilbutiril-CoA de acuerdo con (ii) [etapa 5] es una enzima que se clasifica como EC 1.3.-.- y que es una oxidorreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH.
18. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la enzima se selecciona de entre el grupo que consiste en
- (i) una acil-CoA deshidrogenasa (NADP+) (EC 1.3.1.8);
 - (ii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.10);
 - (iii) una cis-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.37);
 - (iv) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.38);
 - (v) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Re) (EC 1.3.1.39);
 - (vi) crotonil-CoA reductasa (EC 1.3.1.86);
 - (vii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADH) (EC 1.3.1.9);
 - (viii) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD⁺) (EC 1.3.1.44); y
 - (ix) una isovaleril-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.8.4).
19. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de la 3-metilglutaconil-CoA en 3-metilcrotonil-CoA de acuerdo con (iii) es una enzima que es una 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.4), geranoil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.5) o una glutaconil-CoA decarboxilasa (EC 4.1.1.70).
20. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 que expresa adicionalmente una enzima capaz de la conversión enzimática del alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo).
21. El organismo o microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la enzima capaz de la conversión enzimática de alcohol isoamílico en acetato de 3-metilbutilo (acetato de isoamilo) es una alcohol-O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.84).

22. El uso de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), para la conversión de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiraldehído.
- 5
23. El uso
- (i) de una combinación de una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), y
- 10 una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con NADH o NADPH como donante, o
- (ii) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84)
- 15 para la conversión de 3-metilbutiril-CoA en alcohol isoamílico.
24. El uso de una combinación que comprende
- (i) una oxidoreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-), y
- (ii) una enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo tioéster de CoA de la acil-CoA como receptor con NADH o NADPH como donante, en el que dicha enzima que se clasifica como EC 1.2.1.- es una acetaldehído deshidrogenasa (acetilación) (EC 1.2.1.10) o una propanal deshidrogenasa (propanoilación de CoA) (EC 1.2.1.87), y
- 20 una enzima que se clasifica como EC 1.1.1.- y que es una oxidoreductasa que actúa sobre el grupo aldehído como receptor con NADH o NADPH como donante, o
- (iii) una acil de cadena corta formador de alcohol-CoA deshidrogenasa/acil graso-CoA reductasa o una acil graso formador de alcohol-CoA reductasa (acil de cadena larga-CoA: NADPH reductasa) (EC 1.2.1.84);
- 25 para la conversión enzimática de 3-metilcrotonil-CoA en alcohol isoamílico.
25. El uso de la reivindicación 24, en el que la oxidoreductasa que actúa sobre un grupo CH-CH (EC 1.3.-) de acuerdo con (i) se selecciona de entre el grupo que consiste en
- (i) una acil-CoA deshidrogenasa (NADP+) (EC 1.3.1.8);
- 30 (ii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Si) (EC 1.3.1.10);
- (iii) una cis-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.37);
- (iv) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH) (EC 1.3.1.38);
- (v) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADPH, específica de Re) (EC 1.3.1.39);
- (vi) crotonil-CoA reductasa (EC 1.3.1.86);
- 35 (vii) una enoil-[proteína portadora de acilos] reductasa (NADH) (EC 1.3.1.9);
- (viii) una trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD⁺) (EC 1.3.1.44); y
- (ix) una isovaleril-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.8.4).

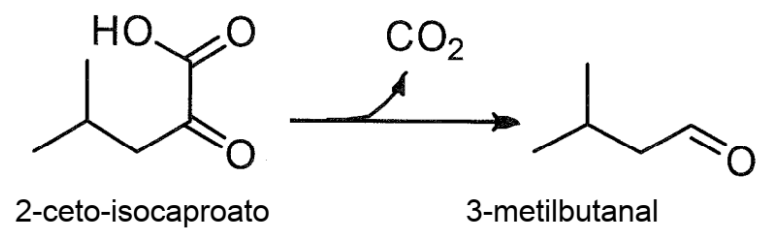


Figura 1

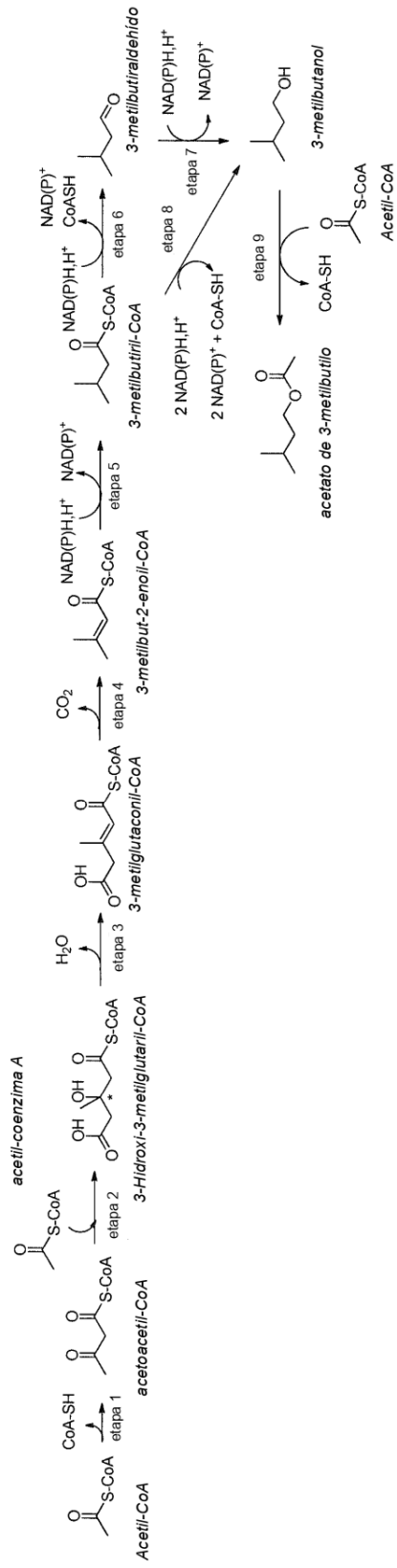


Figura 2

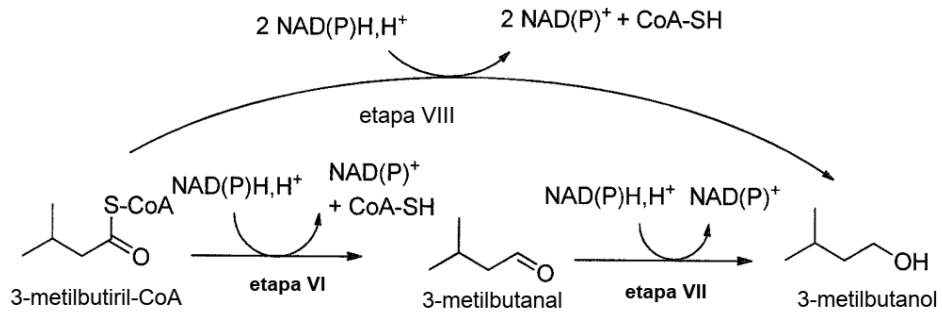


Figura 3

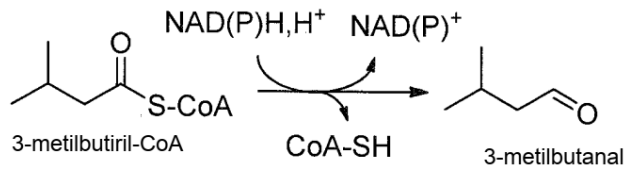


Figura 4

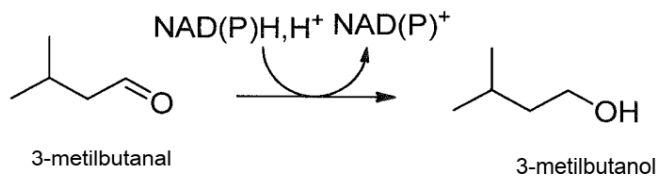


Figura 5

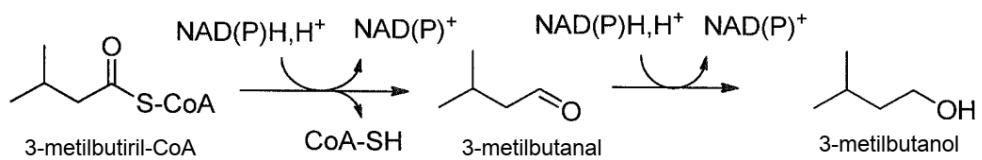
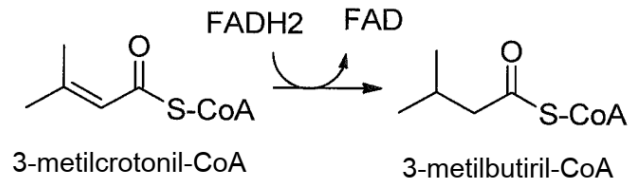
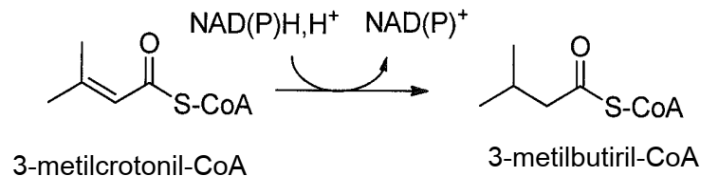


Figura 6



Figuras 7a y b

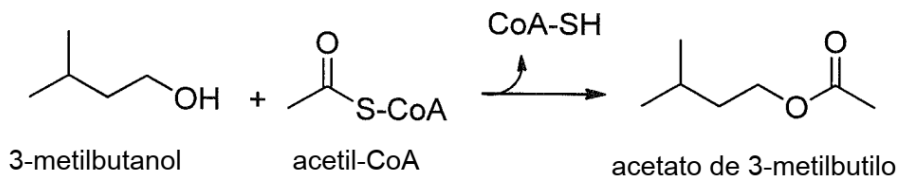


Figura 8

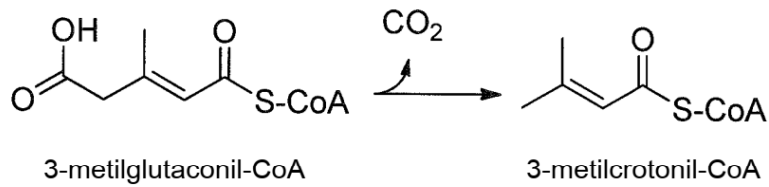


Figura 9

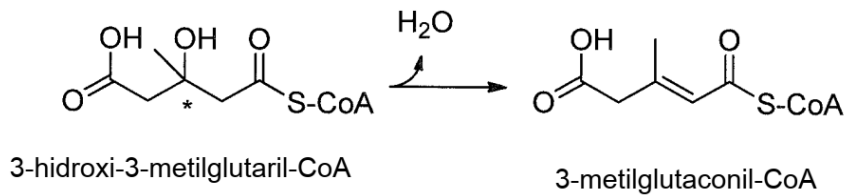


Figura 10

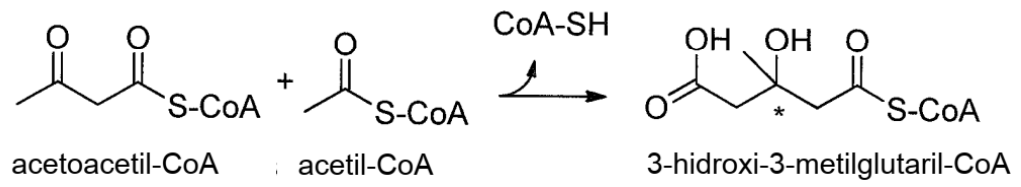


Figura 11

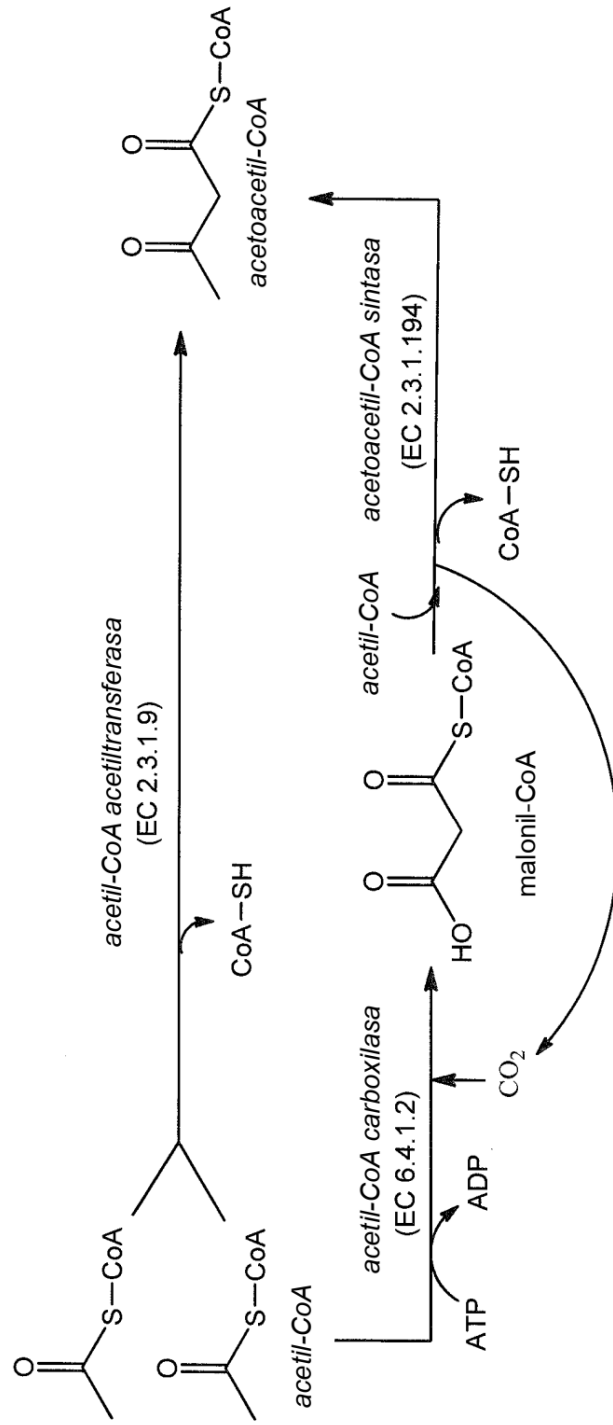


Figura 12

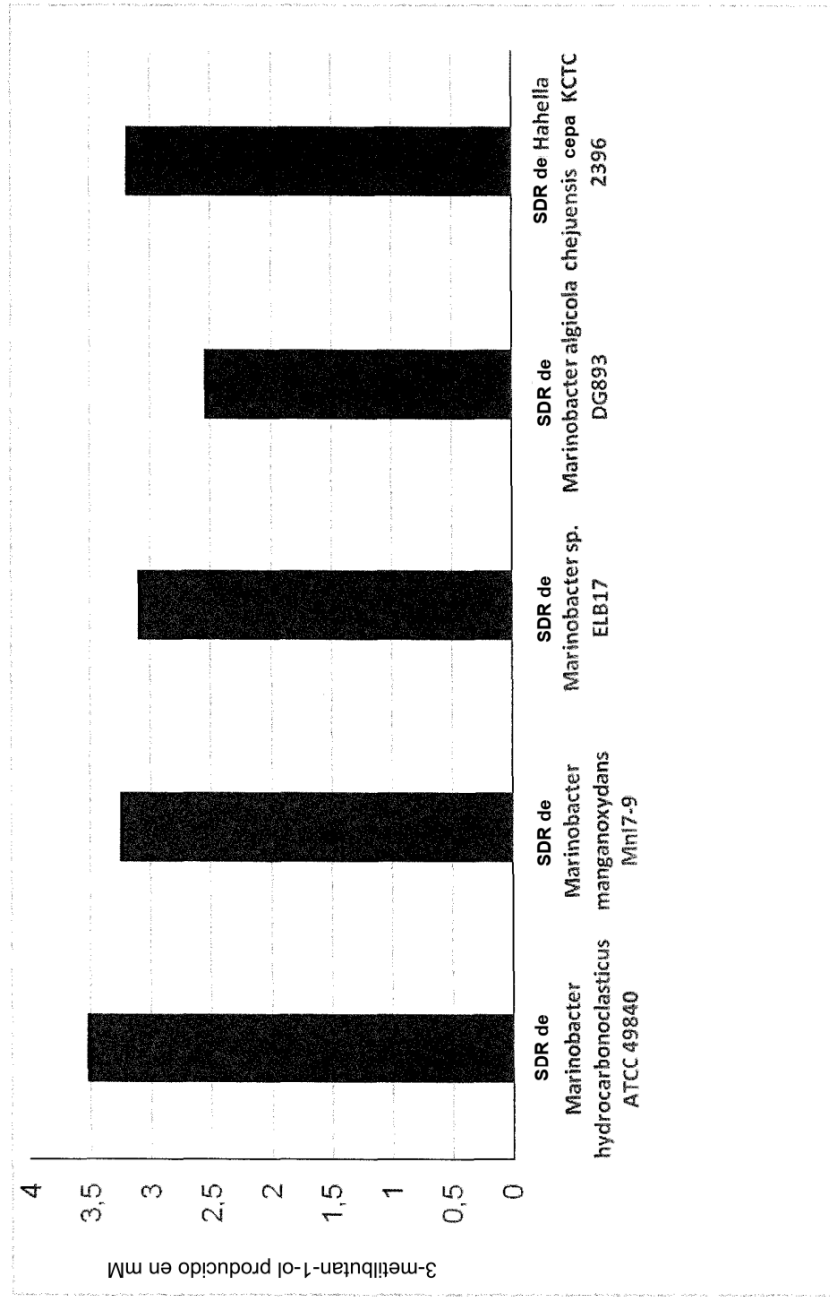


Figura 13