



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-100240- -00000-0000

Fecha: 2013-04-18 16:49:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 97

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO PRODUCCION DE ALQUENOS MEDIANTE CONVERSION

ENZIMATICA COMBINADA DE ACIDOS

3-HIDROXIALCANOICOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

GLOBAL BIOENERGIES Y

71. SOLICITANTE SCIENTIST OF FORTUNE S.A. RESPECTIVAMENTE

EVRY CEDEX, FRANCIA Y

DOMICILIO LUXEMBURGO, LUXEMBURGO RESPECTIVAMENTE

74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-100240- -00000-0000 Fecha: 2013-04-18 16:49:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII Act. 411 PRESENTACION Folios: 97
--	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/EP2011/068174	Fecha 2011/10/18
Publicación Internacional No.		WO 2012/052427 A1	Fecha 2012/04/26
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
PRODUCCIÓN DE ALQUENOS MEDIANTE CONVERSIÓN ENZIMÁTICA COMBINADA DE ÁCIDOS 3-HIDROXIALCANOICOS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
C12N 009/088, C12P 005/002			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
1. GLOBAL BIOENERGIES			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		5 rue Henri Desbruères, F-91030 Evry Cedex, Francia	No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD		Evry Cedex	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
DEPARTAMENTO/ESTADO			NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		Francia	Francia
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. MARLIÈRE		Philippe	Francés
2. DELCOURT		Marc	Francés
3. ANISSIMOVA		Maria	Rusa
4. TALLON		Richard	Francés
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Bélgica		Mouscron	173, rue de Rolleghem, B-7700 Mouscron,
2. Francia		Paris	50, rue de Patay, F-75013 Paris,
3. Francia		Nozay	3, rue Albert Camus, F-91620 Nozay,
4. Francia		Orsay	27, rue de Chartres, F-91400 Orsay,
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☒ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			

9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS De Páez		NOMBRES Luz Clemencia	IDENTIFICACIÓN C.C . 35.456.344 T.P . 23.555
DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35		No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD	BOGOTA		CORREO ELECTRÓNICO cavelier@cavelier.com
PAÍS	COLOMBIA		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN EUROPA		CÓDIGO PAÍS EP	(31) NÚMERO 10188001.1
(32) FECHA (AAAA/MM/DD) 2010/10/19			
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. 13-0035816 No. 13-0032903	Fecha: 2013/04/16 Fecha: 2013/04/09
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL		
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)			
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma <i>Luz Clemencia De Paez</i> <i>TP #23555 155</i>	
C.C 35.456.344 de Usaquen		Tarjeta Profesional 23.555	

17	ANEXOS
----	--------

Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: <u>37</u> 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: <u>19</u> 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: <u>13</u> 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital. ☒ Informe del Examen Preliminar Internacional. ☒ Forma PCT/IB/306. Notificación correspondiente a la inscripción de SCIENTIST OF FORTUNE S.A. como solicitante. ☒ Forma PCT/IB/306. Notificación correspondiente a la inscripción de Philippe MARLIÈRE como invnetor para todos los estados designados y solicitante unicamente para Estados Unidos de América.	Documentación Jurídica 9. ☐ Poderes, si fuera el caso. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☒ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$500.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por 9 reivindicaciones adicionales a 10 por \$270.000.
--	--



HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD		NUMERO DE RADICACIÓN		
☒ Patente de invención			FECHA DE PRESENTACIÓN		
☐ Patente de Modelo de Utilidad					
4	(71) SOLICITANTE (S)				
2.		APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
		SCIENTIST OF FORTUNE S.A.			
5	DATOS DEL SOLICITANTE				
PAÍS DE RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN	
2. Luxemburgo			Luxemburgo	7A, rue des Glacis, L-1628 Luxemburgo, Luxemburgo	
TELÉFONO		FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD	
6	(72) INVENTOR (ES)				
APELLIDOS		NOMBRE		NACIONALIDAD	
7	DATOS INVENTOR (ES)				
DIRECCIÓN		CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA	
9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD				
PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)	

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
26 April 2012 (26.04.2012)

(10) International Publication Number
WO 2012/052427 A1

(51) International Patent Classification:
C12N 9/88 (2006.01) *C12P 5/02* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2011/068174

(22) International Filing Date:
18 October 2011 (18.10.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
10188001.1 19 October 2010 (19.10.2010) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): **GLOB-
AL BIOENERGIES** [FR/FR]; 5 rue Henri Desbruères,
F-91030 Evry Cedex (FR).

(72) Inventor; and

(71) Applicant : **MARLIÈRE, Philippe** [FR/BE]; 173, rue
de Rollegem, B-7700 Mouscron (BE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **DELCOURT,**
Marc [FR/FR]; 50, rue de Patay, F-75013 Paris (FR).
* **ANISSIMOVA, Maria** [RU/FR]; 3, rue Albert Camus,
F-91620 Nozay (FR). **TALLON, Richard** [FR/FR]; 27,
rue de Chartres, F-91400 Orsay (FR).

(74) Agent: **Vossius & Partner** (No. 31); Siebertstraße 4,
81675 München (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))



WO 2012/052427 A1

(54) Title: PRODUCTION OF ALKENES BY COMBINED ENZYMATIC CONVERSION OF 3-HYDROXYALKANOIC ACIDS

(57) Abstract: The present invention relates to a method for generating alkenes through a biological process. More specifically, the invention relates to a method for producing alkenes (for example propylene, ethylene, 1-butylene, isobutylene or isoamylene) from molecules of the 3-hydroxyalkanoate type.

PRODUCCIÓN DE ALQUENOS MEDIANTE CONVERSIÓN ENZIMÁTICA COMBINADA DE ÁCIDOS 3-HIDROXIALCANOICOS

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

En la actualidad se deriva una gran serie de compuestos químicos a partir de petroquímicos. Los alquenos (tal como etileno, propileno, los diferentes butenos, o bien los pentenos, por ejemplo) se utilizan en la industria de los plásticos, por ejemplo para producir polipropileno o polietileno, y en otras áreas de la industria química y en la industria de combustibles.

El etileno, el alqueno más simple, se encuentra en el centro de la química industrial: es el compuesto orgánico que se produce más ampliamente en el mundo. Se utiliza en particular para producir polietileno, un plástico principal. El etileno también se puede convertir en muchos productos industrialmente útiles mediante reacción (de oxidación, de halogenación).

El propileno mantiene una función de forma similar importante: su polimerización resulta en un material plástico, polipropileno. Las propiedades técnicas de este producto en términos de resistencia, densidad, solidez, deformabilidad, y transparencia son inigualables. La producción de polipropileno alrededor del mundo ha crecido continuamente desde su invención en 1954.

El butileno existe en cuatro formas, una de las cuales, isobutileno, ingresa en la composición de metil-tert-butil-éter(MTBE), un aditivo antidetonante para combustible de automóviles. También se puede utilizar isobutileno para producir isoocteno, que a su vez se puede reducir a isooctano (2,2,4-trimetilpentano); la muy alta clasificación del octano de isooctano lo hace el mejor combustible para los así llamados motores de "gasolina".

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

Todos estos alquenos se producen actualmente mediante el craqueo catalítico de productos de petróleo (o mediante un derivado del proceso Fisher-Tropsch en el caso de hexeno, de carbón o gas). Su costo por lo tanto se indexa naturalmente al precio del crudo. Más aún, el craqueo catalítico algunas veces se asocia con dificultades técnicas considerables que aumentan la complejidad del proceso y los costos de producción.

Independientemente de las consideraciones anteriores, la bioproducción de plásticos ("bioplásticos") es un campo floreciente. Este auge se debe a intereses económicos vinculados al precio del crudo, y por consideraciones ambientales que son tanto globales (productos de carbono neutros) como locales (manejo de residuos).

La familia principal de los bioplásticos es aquella de los polihidroxicanoatos (PHA). Estos son polímeros obtenidos mediante la condensación de moléculas que comprende un grupo ácido y un grupo alcohol. La condensación tiene lugar mediante esterificación del ácido en el alcohol del siguiente monómero. Este enlace de éster no es tan estable como el enlace de carbono-carbono directo presente en los polímeros de plásticos convencionales, que explica porqué los PHA tienen una biodegradabilidad de unas pocas semanas a unos pocos meses.

La familia de PHA incluye en particular poli-3-hidroxibutirato (PHB), un polímero de 3-hidroxibutirato, y polihidroxibutirato-valerato (PHBV), un polímero alterno de 3-hidroxibutirato y 3-hidroxivalerato.

El PHB se produce en forma natural por algunas cepas de bacterias tales como *Alcaligenes eutrophus* y *Bacillus megaterium*. Se han construido bacterias de laboratorio, como *E. coli*, que tienen rutas sintéticas integradas que en general conducen a PHB o a PHA. El compuesto o su polímero, en ciertas condiciones de laboratorio, puede contabilizar hasta 80% de la masa bacteriana (Wong MS et al., *Biotech. Bioeng.* 99 (2008), 919-928). La producción de PHB a escala industrial se intentó en 1980, pero en el momento se consideraron muy altos los costos para producir el compuesto mediante fermentación. Los proyectos que involucran la producción directa de estos compuestos en plantas modificadas genéticamente (han integrado las enzimas clave de la ruta sintética PHB presente en las bacterias producidas) están en progreso y podrían implicar menores costos de operación.

La producción biológica de los alcanos u otras moléculas de hidrocarburos que se

pueden utilizar como combustibles o como precursores de resinas sintéticas se denomina en el contexto de una operación industrial sostenible en armonía con los ciclos geoquímicos. La primera generación de biocombustibles consiste en la producción fermentativa de etanol, como procesos de fermentación y destilación que ya existen en la industria de procesamiento de alimentos. La producción de la segunda generación de biocombustibles está en una fase exploratoria, que abarca en particular la producción de alcoholes de cadena larga (butanol y pentanol), terpenos, alcanos lineales y ácidos grasos. Dos revisiones recientes proporcionan una vista general de investigación en este campo: Ladygina N et al., *Process Biochemistry*, 2006, 41:1001; y Wackett LP, *Current Opinions in Chemical Biology*, 2008, 21:187.

En la familia de químicos alqueno, isopreno (2-metil-1,3-butadieno) es el motivo terpeno que, a través de polimerización, conduce a caucho. Otros terpenos se pueden desarrollar, mediante rutas químicas, biológicas o mezcladas, como productos utilizables tales como biocombustibles o con la fabricación de plásticos. La literatura reciente muestra que la ruta mevalonato (un intermedio clave en la biosíntesis de esteroides en muchos organismos) se puede utilizar con el fin de producir eficientemente productos de la familia terpeno en producciones industriales (Withers ST et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73:6277).

Evidentemente se ha investigado de forma menos extensa la producción de alquenos, en particular alquenos terminales, [etileno mono- o di-sustituidos en la posición 2: $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{R}^1)(\text{R}^2)$]. Se ha descrito la conversión de isovalerato a isobutileno mediante la levadura *Rhodotorula minuta* (Fujii T. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, 54:583), pero la eficiencia de esta reacción, caracterizada por un valor muy bajo del número de rotación (k_{cat} es $1 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$), está lejos de permitir una aplicación industrial. El mecanismo de reacción es aclarado por Fukuda H et al. (BBRC, 1994, 201(2):516) e involucra una enzima de citocromo P450 que descarboxila el isovalerato mediante la reducción de un grupo oxoferrilo $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$. En ningún punto la reacción involucra la hidroxilación de isovalerato. El isovalerato también es un intermedio en el catabolismo de leucina. La biosíntesis a gran escala de isobutileno mediante esta ruta parece altamente desfavorable, debido a que requerirá la síntesis y degradación de una molécula de leucina para formar una molécula de isobutileno. También, la enzima que cataliza la reacción utiliza hemo como cofactor, llevando pobremente en sí misma a expresión recombinante en bacterias y a la mejora de los parámetros de enzima. Por todas estas razones,

parece muy improbable que esta ruta de la técnica anterior puede servir como una base para la explotación industrial. Se han descrito otros microorganismos como marginalmente capaces de producir en forma natural el isobutileno a partir de isovalerato; los rendimientos obtenidos son incluso menores que aquellos obtenidos con *Rhodotorula minuta* (Fukuda H. et al, Agric. Biol. Chem., 1984, 48:1679).

Los mismos estudios también han descrito la producción natural de propileno: muchos microorganismos son capaces de producir propileno, una vez de nuevo con una producción extremadamente baja. La producción de etileno mediante plantas ha sido durante mucho tiempo conocida (Meigh et al, 1960, Nature, 186:902). De acuerdo con la ruta metabólica aclarada, la metionina es el precursor de etileno (Adams and Yang, PNAS, 1979, 76:170). También se ha descrito la conversión de 2-oxoglutarato (Ladygina N et al., Process Biochemistry 2006, 41:1001). Debido a que la producción de una molécula de dos carbonos de etileno consume un precursor de molécula de cuatro o cinco carbonos, estas rutas parecen materialmente y energéticamente desfavorables para su aplicación industrial.

Sin embargo, hay una necesidad de métodos eficientes para producir alquenos tales como etileno, propileno, 1-butileno, isobutileno, 1-amileno o isoamileno.

El documento WO2010/001078 describe un proceso para producir alquenos mediante la conversión enzimática de ácidos 3-hidroxiálcanoicos con una enzima que tiene la actividad de una descarboxilasa. Dicho método es ventajoso debido a que ayuda a evitar el uso de productos de petróleo, a disminuir los costos para producir plásticos y combustibles y puede tener un impacto ambiental global considerable para permitir que el carbono sea almacenado en forma sólida. Aunque el método descrito en el documento WO 2010/001078 permite producir alquenos al convertir enzimáticamente 3-hidroxiálcanoatos, subsiste una necesidad de mejoras, en particular con respecto a la eficiencia del proceso con el fin de realizarlo en forma adecuada para propósitos industriales. La presente solicitud supera esta necesidad.

La presente invención describe un método para producir compuestos alqueno partiendo de un 3-hidroxiálcanoato a través de un proceso biológico, en particular un proceso enzimático, en el que se combinan dos tipos de enzimas con el fin de aumentar la eficiencia del índice de producción. Más específicamente, la presente invención se relaciona con un método para producir un alqueno, caracterizado porque este comprende la conversión de un 3-hidroxiálcanoato en dicho alqueno

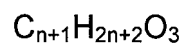
mediante

- (i) una primera enzima que tiene una actividad para convertir el 3-hidroxiacanoato en el 3-fosfoxiacanoato correspondiente; y
- (ii) una segunda enzima que es diferente de la primera enzima y tiene una actividad para convertir dicho 3-fosfoxiacanoato en dicho alqueno.

La presente invención también se relaciona con el uso de por lo menos dos enzimas, en donde una enzima se selecciona de (i) como se especificó anteriormente y la otra enzima se selecciona de (ii) como se especificó anteriormente o de un microorganismo que produce dicha combinación de enzimas, para producir un compuesto alqueno de un 3-hidroxiacanoato.

La presente invención también se relaciona con organismos, preferiblemente microorganismos, que producen por lo menos dos enzimas, en donde una enzima se selecciona de (i) como se especificó anteriormente y la otra enzima se selecciona de (ii) como se especificó anteriormente.

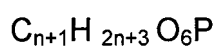
“3-hidroxiacanoato”, como se utiliza aquí, denota una molécula que responde a la siguiente fórmula general:



, con $1 < n < 7$, y que comprende 3-hidroxiacetato como un motivo común (Figura 1), y opcionalmente una o dos sustituciones alquilo en el carbono 3. Dichos residuos alquilo o grupos pueden ser lineales o ramificados. Como se utiliza aquí, los términos “alcoilo” y “alquilo” tienen el mismo significado y son intercambiables. De forma similar, los términos “residuo” y “grupo” tienen el mismo significado y son intercambiables. Los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo son ejemplos de dichos grupos alquilo. El carbono 3 llega a ser un centro quiral si las dos sustituciones alquilo son diferentes. La presente definición abarca las dos formas quirales, incluso si una de las dos formas, por ejemplo la forma R, es la forma principal producida en forma natural. Ejemplos de 3-hidroxiacanoatos se presentan en la Figura 3. Opcionalmente, se pueden agregar sustituyentes alquilo en el carbono 2, que también luego llegan a ser quirales (si los dos sustituyentes son diferentes). Del mismo modo, las configuraciones de los sustratos 3-hidroxiacanoato en la presente invención abarca todos los estereoisómeros. En una realización preferida, los 3-hidroxiacanoatos corresponden ya sea a 3-hidroxiacetato o a

variantes o derivados de 3-hidroxipropionato en los que uno de los dos o los dos átomos de hidrógeno llevados en el carbono 3 se sustituyen por un motivo compuesto únicamente de átomos de carbono e hidrógeno, el número de átomos de carbono de dichos sustituyentes varía de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 3, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo o isobutilo. El sufijo "oato", como se utiliza aquí, puede denotar intercambiamente el ión carboxilato (COO^-) o ácido carboxílico (COOH). No se utiliza para denotar un éster. En una realización particular, los 3-hidroxialcanoatos se representan por la siguiente fórmula: $\text{HO-CO-CH}_2\text{-C(R}^1\text{)(R}^2\text{)-OH}$ o $\text{O}^-\text{-CO-CH}_2\text{-C(R}^1\text{)(R}^2\text{)-OH}$.

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



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

El término "alqueno", como se utiliza aquí, denota moléculas compuestas únicamente de carbono e hidrógeno, que contiene un enlace doble carbono-carbono y tiene la fórmula química de un hidrocarburo mono-insaturado, C_nH_{2n} , en donde n es igual por lo menos a dos. Preferiblemente, n es igual a por lo menos 3, 4, 5 o 6. Más preferiblemente n es más de 6. Sin embargo, de manera general, el término "alqueno" se refiere a una molécula que responde a la Fórmula C_nH_{2n} , con $1 < n < 7$.

En una realización preferida los alquenos se representan por la fórmula estructural $\text{H}_2\text{C}=\text{C(R}^1\text{)(R}^2\text{)}$ en donde R^1 y R^2 se seleccionan, independientemente, del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno y un radical alquilo lineal o ramificado, de tal manera que el número total de átomos de carbono en la molécula de alqueno es más de 6.

Ejemplos preferidos de compuestos alqueno de acuerdo con la invención son en particular etileno, propileno, isobutileno, y isoamileno (Figura 4), o de otra manera 1-butileno y 1-amileno.

"Fuente de carbono", como se utiliza aquí, denota cualquier compuesto de carbono que se puede utilizar como sustrato para los organismos de acuerdo con la invención. Dicho término incluye glucosa o cualquier otra hexosa, xilosa o cualquier

otra pentosa, polioles tales como glicerol, sorbitol o mnitol, o de otra manera polímeros tales como almidón, celulosa o hemicelulosa, o de otra manera poli-3-hidroxicanoatos como poli-3-hidroxibutirato. Puede ser cualquier sustrato que permite el crecimiento de microorganismos, tal como por ejemplo formiato. También puede ser CO_2 en el caso en donde los organismos son capaces de llevar a cabo la fotosíntesis.

“Recombinante”, como se utiliza aquí, denota la modificación genética artificial de un organismo, mediante la adición, retiro, o modificación de un gen cromosómico o extra-cromosómico o motivo regulador tal como un promotor, o mediante la fusión de organismos, o mediante la adición de un vector de cualquier tipo, por ejemplo de plásmido. El término “expresión recombinante” denota la producción de una proteína que involucra una modificación genética, preferiblemente con el fin de producir una proteína de origen exógeno o heterólogo con respecto a su anfitrión, es decir, que no ocurre en forma natural en el anfitrión de producción, o con el fin de producir una proteína endógena mutada o modifica.

“Sobreexpresión” o “sobreexpresar”, como se utiliza aquí, denota la expresión recombinante de una proteína en un organismo anfitrión, preferiblemente que se origina de un organismo diferente de uno en el que se expresa, se aumenta mediante por lo menos 10% y preferiblemente mediante 20%, 50%, 100%, 500% y posiblemente más cuando se compara con la expresión natural de dicha proteína que ocurre en dicho organismo anfitrión. Esta definición también abarca el caso en donde no hay expresión natural de dicha proteína.

Un “co-sustrato” es una composición o molécula agregada a la reacción enzimática, con el fin de mejorar ciertos parámetros del mismo, y toda la actividad del mismo, dicho producto y el sustrato principal se consume en cantidades iguales. El co-sustrato por lo tanto se puede agregar a la reacción en una concentración comparable con aquella del sustrato principal. Dependiendo de la enzima, se puede requerir la presencia de un co-sustrato para la reacción enzimática.

Un “cofactor” es un producto agregado a la reacción enzimática, con el fin de mejorar ciertos parámetros del mismo y por encima de todo mejorar la actividad del mismo, dicho producto no se consume durante la reacción, y por lo tanto solo necesita ser agregado a una concentración baja, proporcional a la cantidad de la enzima, dicha concentración por lo tanto se denomina como “catalítica”.

Una "parte" de una secuencia de aminoácidos denota un fragmento que comprende por lo menos 10, preferiblemente por lo menos 20, 30, 40 o 50 residuos de aminoácido consecutivos de dicha secuencia.

"Homología", como se utiliza aquí, denota la existencia de una similitud entre dos secuencias cuando se mide por el porcentaje de identidad entre dichas dos secuencias. En una realización preferida el término "homología" significa identidad de secuencia.

Los compuestos químicos se conocen frecuentemente por varios nombres, oficiales o comunes. Aquí, se prefieren nombres comunes de las moléculas. Sin embargo:

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

La presente invención describe un método para producir compuestos alqueno partiendo de un 3-hidroxiálcanoato a través de un proceso biológico, en particular un proceso enzimático, en el que se combinan dos tipos de enzimas con el fin de aumentar la eficiencia del índice de producción. Más específicamente, la presente invención se relaciona con un método para producir un alqueno, caracterizado porque este comprende la conversión de un 3-hidroxiálcanoato en dicho alqueno mediante

- (i) una primera enzima que tiene una actividad para convertir el 3-hidroxiálcanoato en el 3-fosfonoxiálcanoato; y
- (ii) una segunda enzima que es diferente de la primera enzima y tiene una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxiálcanoato en dicho alqueno.

Como se mencionó anteriormente, el documento WO 2010/001078 describe un

proceso para producir alquenos mediante la conversión enzimática de ácidos 3-hidroxiálcanoicos con una enzima que tiene la actividad de una descarboxilasa. Se ha descrito en el documento WO 2010/001078 que de manera general la conversión de un 3-hidroxiálcanoato en un alqueno por una enzima que tiene una actividad descarboxilasa, por ejemplo una descarboxilasa mevalonato difosfato (MDP) (E.C. 4.1.1.33) tiene lugar mediante la conversión del 3-hidroxiálcanoato en el 3-fosfonoxiálcanoato que luego se descarboxila para llevar al alqueno correspondiente. La reacción genérica llevada a cabo por descarboxilasa MDP utilizando diversos 3-hidroxiálcanoatos se describe en la Figura 2B.

Ahora se ha encontrado que diferentes descarboxilasas, en particular descarboxilasas mevalonato difosfato, catalizan las dos etapas mencionadas anteriormente con diferentes eficiencias, es decir que algunas descarboxilasas catalizan la primera etapa con una eficiencia mayor diferente a las descarboxilasas y que algunas descarboxilasas muestran una preferencia para la segunda etapa, es decir la etapa de descarboxilación, y por lo tanto la eficiencia de la conversión del 3-hidroxiálcanoato en el alqueno como se describe en el documento WO 2010/001078 se puede aumentar de forma significativa al combinar las enzimas correspondientes. Sin embargo, la presente invención en particular se relaciona con un método para lograr una eficiencia mayor en la producción enzimática de alquenos de 3-hidroxiálcanoatos, es decir un método para mejorar la eficiencia de dicha producción enzimática.

El término "una enzima que tiene una actividad para convertir el 3-hidroxiálcanoato en el 3-fosfonoxiálcanoato" significa una enzima que puede fosforilar un 3-hidroxiálcanoato en el 3-fosfonoxiálcanoato. El grupo fosfato preferiblemente viene de una molécula ATP.

Esta actividad, por ejemplo, se puede medir como se describe en los Ejemplos adjuntos, en particular Ejemplo 5. Una posibilidad es incubar así la enzima respectiva con el 3-hidroxiálcanoato y ATP y para medir la producción de ADP (que refleja la producción del 3-fosfonoxiálcanoato correspondiente). Los ensayos para medir la producción de ADP se conocen por la persona experta en la técnica. Uno de estos métodos es el ensayo de deshidrogenasa piruvato quinasa/lactato descrito en el Ejemplo 5. En este caso el ensayo mide el índice de absorbancia NADH reducida a 340 nm que es proporcional a la cantidad de ADP. En una realización preferida el término "una enzima que tiene una actividad para convertir el 3-hidroxiálcanoato en

el 3-fosfonoxialcanoato” significa una enzima que puede convertir 3-hidroxiisovalerato y ATP en 3-fosfonoxiisovalerato y ADP. Incluso más preferiblemente dicha enzima puede catalizar la reacción para convertir el 3-hidroxiisovalerato en el 3-fosfonoxiisovalerato, preferiblemente la reacción para convertir 3-hidroxiisovalerato y ATP en 3-fosfonoxiisovalerato y ADP, con un K_M de 10 mM o menos, por ejemplo con un K_M de 5 mM o menos, preferiblemente de 1 mM o menos y incluso más preferiblemente de 0.1 mM o menos. En una realización particularmente preferida dicha enzima puede catalizar la reacción para convertir el 3-hidroxiisovalerato en el 3-fosfonoxiisovalerato, preferiblemente la reacción para convertir 3-hidroxiisovalerato y ATP en 3-fosfonoxiisovalerato y ADP, con un k_{cat} de por lo menos 0.2 s^{-1} , preferiblemente con un k_{cat} de por lo menos 0.5 s^{-1} , particularmente preferido con un k_{cat} de por lo menos 1.0 s^{-1} , más preferido de por lo menos 2.0 s^{-1} e incluso más preferido con un k_{cat} de por lo menos 5.0 s^{-1} .

En una realización particularmente preferida la capacidad de convertir 3-hidroxiisovalerato y ATP en 3-fosfonoxiisovalerato y se mide el ADP en un ensayo como se describe en el Ejemplo 5.

El término “una enzima tiene una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno” significa una enzima que puede catalizar una reacción mediante la cual hay una descarboxilación y desfosforilación del 3-fosfonoxialcanoato que conduce por lo tanto al alqueno correspondiente.

Esta actividad, por ejemplo, se puede medir como se describe en los Ejemplos adjuntos, en particular en el Ejemplo 8. Una posibilidad es así para incubar la enzima respectiva con el fosfonoxialcanoato correspondiente bajo condiciones que en principio permiten la descarboxilación y la desfosforilación y para detectar la producción del alqueno correspondiente, por ejemplo mediante cromatografía de gas. En una realización preferida el término “una enzima tiene una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno” significa una enzima que puede convertir 3-fosfonoxiisovalerato en isobuteno, preferiblemente bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 8. Incluso más preferiblemente dicha enzima puede catalizar la reacción para convertir el 3-fosfonoxialcanoato en el alqueno correspondiente (por medio de descarboxilación y desfosforilación) con un K_M de 100 mM o menos, por ejemplo con un K_M de 75 mM o menos, o con un K_M de 50 mM o menos, preferiblemente de 10 mM o menos o 5 mM o menos o 1 mM o menos, y incluso más preferiblemente de 0.1 mM o menos. En una realización particularmente

preferida dicha enzima puede catalizar la reacción para convertir el 3-fosfonoxialcanoato en el alqueno correspondiente, preferiblemente la reacción para convertir 3-fosfonoxiisovalerato en isobuteno, con un k_{cat} de por lo menos 10^{-6} s^{-1} , preferiblemente con un k_{cat} de por lo menos 10^{-4} s^{-1} , por ejemplo con un k_{cat} de por lo menos 10^{-3} s^{-1} o con un k_{cat} de por lo menos 10^{-2} s^{-1} , tal como con un k_{cat} de por lo menos 10^{-1} s^{-1} , por ejemplo con un k_{cat} de por lo menos 0.2 s^{-1} , preferiblemente con un k_{cat} de por lo menos 0.5 s^{-1} , particularmente preferido con un k_{cat} de por lo menos 1.0 s^{-1} , más preferido de por lo menos 2.0 s^{-1} e incluso más preferido con un k_{cat} de por lo menos 5.0 s^{-1} .

En una realización particularmente preferida la capacidad de convertir 3-fosfonoxiisovalerato en isobuteno se mide en un ensayo como se describe en el Ejemplo 8.

En una realización preferida una enzima mencionada en (i) y (ii), anterior, es una enzima que se considera por NCBI o un motor equivalente que tiene un dominio COG3407.

En una realización preferida del método de acuerdo con la invención la primera enzima (i) que tiene una actividad para convertir el 3-hidroxialcanoato en el 3-fosfonoxialcanoato se selecciona del grupo que consiste de

- (A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y muestra una actividad para convertir el 3-hidroxialcanoato en el 3-fosfonoxialcanoato que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1;
- (B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y muestra una actividad para convertir el 3-hidroxialcanoato en el 3-fosfonoxialcanoato que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2;
- (C) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en

SEQ ID NO: 3 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 y muestra una actividad para convertir el 3-hidroxiacanoato en el 3-fosfonoxiacanoato que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; y

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

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

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

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

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

En una realización preferida adicional del método de acuerdo con la invención la segunda enzima (ii) tiene una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxiacanoato en dicho alqueno se selecciona del grupo que consiste de

- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxiacanoato

en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5;

- (b) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6;
- (c) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 7 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7;
- (d) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 8 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8;
- (e) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 9 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9;
- (f) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 10 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos

mostrada en la SEQ ID NO: 10;

- (g) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 11 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11;
- (h) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 12 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12;
- (i) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 13 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13;
- (j) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 14 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14; y
- (k) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 15 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 15 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 15.

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

En una realización preferida del método de acuerdo con la invención la primera enzima (i) es como se define en (A) anterior y la segunda enzima (ii) es como se define en (a) o (b) mencionado anteriormente, incluso más preferiblemente la segunda enzima es como se define en (f), (g), (h), (i), (j) o (k) mencionado anteriormente. Como se ilustra en los ejemplos, la combinación de estas enzimas es particularmente eficiente en la producción de compuestos alqueno de acuerdo con la presente invención.

En otra realización preferida del método de acuerdo con la invención la segunda enzima (ii) tiene una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno seleccionado de una cualquiera de las proteínas enumerada en la siguiente Tabla o de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos de dicha proteína y muestra

una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de dicha proteína.

Tabla 1

Organismo	GenBank de secuencia de referencia
Methanosarcina mazei	AAM31457.1
Methanocaldococcus jannaschii	AAB98390.1
Staphylococcus saprophyticus	BAE19266.1
Streptococcus agalactiae	EAO73731.1
Enterococcus faecalis	AAO80711.1
Flavobacterium johnsoniae	ABQ04421.1
Bdellovibrio bacteriovorus	CAE79505.1
Chloroflexus aurantiacus	A9WEU8.1
Legionella pneumophila	CAH13175.1
Listeria monocytogenes	EAL09343.1
Metallosphaera sedula	ABP95731.1
Staphylococcus epidermidis	AAO03959.1
Streptococcus thermophilus	AAV60266.1
Bacillus coagulans	EAY45229.1
Chloroflexus aggregans	EAV09355.1
Lactobacillus brevis	ABJ64001.1
Lactobacillus fermentum	BAG27529.1
Lactobacillus plantarum	CAD64155.1
Lactobacillus salivarius	ABD99494.1
Lactococcus lactis sp. lactis	AAK04503.1
Dichelobacter nodosus	ABQ14154.1
Flavobacterium psychrophilum	CAL42423.1
Streptococcus pneumoniae	EDT95457.1
Streptococcus pyogenes	AAT86835.1
Streptococcus suis	ABP91444.1
Staphylococcus haemolyticus	BAE05710.1
Streptococcus equi	ACG62435.1
Arabidopsis thaliana	AAC67348.1
Borrelia afzelii	ABH01961.1
Encephalitozoon cuniculi	CAD25409.1

Streptomyces sp.	BAB07791.1
Streptococcus agalactiae	EAO73731.1
Streptococcus uberis	CAR41735.1
Gallus gallus	XP_423130
Salmo salmar	ACI34234
Natromonas pharaonis	CAI48881.1
Haloarcula marismortui	AAV46412.1
Haloquadratum walsbyi	CAJ51653.1

Como se mencionó anteriormente, no solo las proteínas que tiene las secuencias de aminoácidos mencionadas específicamente enumeradas en las SEQ ID Nos respectivas o se puede utilizar la Tabla 1, pero también las proteínas que se consideran por NCBI o un motor equivalente que tiene un dominio COG3407 y, más preferido, la secuencia de aminoácidos y proteínas las cuales muestran una homología de por lo menos 15% a la secuencia de aminoácidos mencionada específicamente y que tienen una actividad enzimática respectiva por lo menos tan alta como la actividad de una proteína que tienen las secuencias de aminoácidos específicamente mencionadas. Las enzimas preferidas tienen ventajosamente por lo menos x% homología, en donde x se selecciona del grupo que consiste de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60. En una realización preferida adicional la enzima tiene por lo menos 65% de homología de secuencia, preferiblemente por lo menos 70%, more preferiblemente por lo menos 75%, incluso más preferiblemente, por lo menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% homología a una de las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 o a una de las secuencias mostradas en la Tabla 1. El porcentaje de homología de secuencia se puede determinar mediante diferentes métodos y por medio de programas de software conocidos por un experto en la técnica, tal como por ejemplo el método CLUSTAL o BLAST y software derivado, o al utilizar un algoritmo de comparación de secuencia tal como aquel descrito por Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol., 1970, 48:443) o Smith y Waterman (J. Mol. Biol., 1981, 147:195).

Dichas proteínas que muestran el grado indicado de homología, por ejemplo, pueden ser otras enzimas que ocurren en forma natural o que se pueden preparar sintéticamente. Estas incluyen en particular enzimas que se pueden seleccionar por su capacidad de producir los alquenos de acuerdo con la invención. Sin embargo, una prueba de selección comprende poner en contacto la enzima purificada, o un microorganismo que produce la enzima, con el sustrato de la reacción y medir la

producción del compuesto respectivo, es decir el 3-fosfonoxialcanoato o el alqueno. Dichas pruebas se describen en la sección experimental. También se pueden utilizar dichas pruebas de selección para detectar enzimas con una actividad enzimática optimizada para que el sustrato sea convertido en el 3-fosfonoxialcanoato o el alqueno, es decir tiene una actividad optimizada con respecto a uno o más 3-hidroxicanoatos o 3-fosfonoxialcanoatos.

Dichos métodos de detección se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo técnicas de ingeniería de proteína tal como mutagenia aleatoria, mutagenia masiva, mutagenia dirigida a sitio, Mezcla de ADN, mezcla sintética, evolución *in vivo*, o síntesis completa de genes y detección posterior para la actividad enzimática deseada.

La enzima utilizada en la invención sin embargo puede ser natural o sintética, y producida por medios químicos, biológicos o genéticos. También se puede modificar químicamente, por ejemplo con el fin de mejorar su actividad, resistencia, especificidad, purificación, o para inmovilizarla sobre un soporte.

Se ha encontrado que las enzimas que son capaces de catalizar las reacciones descritas anteriormente para convertir un 3-hidroxicanoato en un alqueno por medio de un 3-fosfo-hidroxicanoato son frecuentemente enzimas que se pueden clasificar en la superfamilia filogenética de descarboxilasas mevalonato difosfato (MDP) (nomenclatura de enzima EC 4.1.1.33). La descarboxilasa MDP es una enzima involucrada en la biosíntesis de colesterol. Dicha enzima se aislado de una variedad de organismos que incluyen animales, hongos, levaduras y algunas bacterias. También se puede expresar por algunas plantas (Lalitha et al., *Phytochemistry* 24 (11), (1985), 2569-2571). Muchos genes que codifican esta enzima se han clonado y secuenciado. Estas enzimas de manera general se componen de 300 a 400 aminoácidos y utilizan ATP como co-sustrato, que se convierte durante la reacción para ADP molécula y fosfato inorgánico. El grupo fosfato se transfiere de la ATP al alcohol terciario de mevalonato difosfato, que libera ADP. El intermedio de reacción fosforilado en el grupo 3-hidroxilo luego experimenta la eliminación del grupo de fosfato, en el caso fisiológico que libera el isopentenil difosfato (Figura 2).

De acuerdo con lo anterior, en una realización preferida, la enzima definida en (i) o (ii) anterior, es una descarboxilasa MDP. En el contexto de la presente invención una

descarboxilasa MDP se define como una enzima que por lo menos puede catalizar la conversión de 5-difosfo-3-fosfomevalonato en isopentenil-5-difosfato y CO_2 o que por lo menos puede catalizar la reacción para convertir mevalonato difosfato y ATP en 5-difosfo-3-fosfomevalonato y ADP. Preferiblemente, dicha enzima puede catalizar ambas reacciones.

En otra realización preferida la enzima definida en (i) anterior, es una enzima como se define en (i) (B). La secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2 representa una enzima identificada en *Thermoplasma acidophilum*. En Genbank esta enzima se clasifica como una descarboxilasa mevalonato difosfato. Sin embargo, se conoce de Chen y Poulter (Biochemistry 49 (2010), 207-217) que en *Th. acidophilum* existe una ruta alternativa de mevalonato que involucra la acción de una descarboxilasa mevalonato-5-monofosfato. Sin embargo, es posible que la enzima representada por SEQ ID NO: 2 actualmente representa una descarboxilasa mevalonato-5-monofosfato.

La misma se puede mantener verdadera para otras arqueobacterias. Por lo tanto, en otra realización preferida la enzima definida en (i) o (ii) anterior, es una descarboxilasa mevalonato-5-monofosfato. Dicha enzima es capaz de convertir mevalonato-5-monofosfato en isopentenilpirofosfato.

En realizaciones preferidas de la invención:

- 3-hidroxipropionato se convierte por medio de 3-fosfonoxipropionato en etileno; o
- 3-hidroxibutirato se convierte por medio de 3-fosfonoxibutirato en propileno; o
- 3-hidroxivalerato se convierte por medio de 3-fosfonoxivalerato en 1-butileno; o
- 3-hidroxi-3-metilbutirato (o 3-hidroxiisovalerato) se convierte por medio de 3-fosfonoxi-3-metilbutirato (3-fosfonoxiisovalerato) en isobutileno; o
- 3-hidroxi-3-metilvalerato se convierte por medio de 3-fosfonoxi-3-metilvalerato en isoamileno.

El método de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo *in vitro*, en la presencia de enzimas asiladas (o sistemas de enzima que comprenden adicionalmente uno o más cofactores). *In vitro* preferiblemente significa en un sistema libre de célula.

En una realización, las enzimas empleadas en el método se utilizan en forma purificada para convertir los 3-hidroxiácidos a alquenos. Sin embargo, dicho método puede ser costoso, dicha producción de enzima y sustrato y costos de purificación son altos.

Sin embargo, en otra realización preferida, las enzimas empleadas en el método están presentes en la reacción como un extracto no purificado, o de otra manera en la forma de bacterias no lisadas, con el fin de economizar en los costos de purificación de la proteína. Sin embargo, los costos asociados con dicho método pueden ser muy altos debido a los costos para producir y purificar los sustratos.

De acuerdo con lo anterior, en una realización preferida, las enzimas, naturales o recombinantes, purificadas o no, se utilizan para convertir un 3-hidroxiácido a un alqueno. Para hacer esto, las enzimas se incuban en la presencia del sustrato en condiciones fisicoquímicas que permiten que las enzimas sean activas, y la incubación se deja proceder durante un periodo suficiente. Al final de la incubación, uno opcionalmente mide la presencia del alqueno al utiliza cualquier sistema de detección conocido por un experto en la técnica tal como cromatografía de gas o pruebas calorimétricas para medir la formación del producto de alqueno, o de fosfato libre, o de otra manera para medir la desaparición del sustrato 3-hidroxiácido o de ATP.

En una realización preferida, se agregan cofactores con el fin de imitar mejor la reacción natural o con el fin de proporcionar la complementación estérica o electrónica en la fisura catalítica. Por ejemplo, si una de las enzimas utilizadas en el método de acuerdo con la invención es una enzima que utiliza naturalmente mevalonato difosfato (MDP) como un sustrato, la estructura de 3-hidroxiácidos deja un gran espacio en el vacío de fisura catalítica durante la unión de enzima-sustrato debido de manera general a 3-hidroxiácido que corresponde a un fragmento de MDP. Llenar este espacio con un cofactor para reemplazar la parte faltante del sustrato tiene el propósito de imitar más cercanamente la molécula MDP. Cuando el cofactor no se modifica durante la reacción, por lo tanto se agregará solo en cantidades catalíticas. En el caso en donde el sustrato de la reacción es 3-hidroxiacetato, el cofactor complementario será propil difosfato. En el caso en donde el sustrato es 3-hidroxi-3-metilbutirato, el cofactor complementario será etil difosfato. En el caso en donde el sustrato es 3-

hidroxivalerato o 3-hidroxi-3-metilvalerato, el cofactor complementario será metil difosfato. Estas moléculas diferentes se muestran en la Figura 5. Mediante cambio, puede ocurrir que el cofactor complementario de una reacción tenga un efecto positivo en la reacción para otro sustrato. De manera general, el cofactor puede ser cualquier molécula que comprende un fosfoanhídrido, y por lo tanto tener la fórmula general global $R-PO_2H-O-PO_3H_2$, en la que R es en particular H, un grupo alquilo cíclico, lineal o ramificado, preferiblemente tiene de 1 a 10 o de 1 a 5 átomos de carbono, o cualquier otro grupo orgánico monovalente. Los motivos análogos que corresponden a monoésteres de metileno difosfonato, tienen la fórmula general $R-O-PO_2H-CH_2-PO_3H_2$ en la que fosfianhídrido se reemplaza por un puente de metileno que tiene la ventaja de no ser hidrolizado, también son parte de la invención. Más generalmente, los cofactores pueden ser monofosfato, o incluso libre de fosfato, análogos de las moléculas previas, o de otra manera cualquier otra molécula que puede mejorar la producción de la reacción al proporcionar la complementación estérica o electrónica en el sitio catalítico de enzima. El cofactor se selecciona ventajosamente del grupo que consiste del ión pirofosfato, metil difosfato, etil difosfato, o propil difosfato.

En una realización preferida, la conversión ocurre en la presencia de un co-sustrato, dicho co-sustrato preferiblemente es un compuesto que contiene un fosfoanhídrido, y preferiblemente es ATP, un rNTP, un dNTP o una mezcla de varias de estas moléculas, un polifosfato, o pirofosfato. El co-sustrato está presente de manera general en el anfitrión. Sin embargo, en otra realización particular, se puede agregar un co-sustrato a la reacción, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste de ATP, un rNTP, un dNTP, una mezcla de varios rNTP o dNTP, un polifosfato, y preferiblemente pirofosfato, o un compuesto que contiene un fosfoanhídrido (representado por la fórmula general $X-PO_3H_2$ de la Figura 2).

Aunque la etapa de descarboxilación, es decir la reacción definida como (ii) aquí anteriormente, no requiere el consumo de ATP, se puede mostrar que la presencia de ATP en la reacción puede ser benéfica. Esto se ha demostrado en el Ejemplo 7, utilizando 3-fosfonoxiisovalerato como un sustrato. Se asume que el ATP puede tener un efecto en el plegado de la proteína mediante la unión de ATP al sitio de unión ATP de la descarboxilasa difosfomevalonato. De hecho, esto se puede observar a simple vista: la enzima purificada tiene la tendencia de precipitar, y la adición de ATP evita este efecto. Se considera que no solo ATP sino también otros compuestos similares como dATP, ADP, AMP u otros NTP o dNTP tienen este

efecto. Sin embargo, en una realización preferida, el método de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo con ATP, dATP, ADP, AMP o un NTP diferente a ATP o un dNTP como co-sustrato.

En otra realización preferida el método de acuerdo con la invención se lleva a cabo en el cultivo, en la presencia de un organismo, preferiblemente un microorganismo, que produce las enzimas. Sin embargo, en dicha realización de la invención, se utiliza un organismo, preferiblemente un microorganismo, que produce las enzimas especificadas en (i) y (ii) anterior. En una realización preferida, el (micro)organismo es recombinante en las enzimas especificadas en (i) y (ii) producida por el anfitrión son heterólogas con relación al anfitrión de producción. El método así se puede llevar a cabo en el medio de cultivo, sin la necesidad de separar o purificar las enzimas. En una forma especialmente ventajosa, se utiliza un (micro)organismo que tiene la propiedad natural o artificial de producción endógena de uno o más 3-hidroxicarboxilatos, y también expresar o sobreexpresar la enzimas especificada en (i) y (ii) anterior, natural o modificado, con el fin de producir alquenos directamente de una fuente de carbono presente en la solución.

Por ejemplo, el método de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo al utilizar microorganismos que producen uno o más 3-hidroxicarboxilatos [por ejemplo *Alcaligenes eutrophus* o *Bacillus megaterium*, o de otra manera una cepa *E. coli* genéticamente modificada con el fin de producir dicho producto] y que se ha construido genéticamente por ingeniería de tal manera que sobreexpresan las enzimas como se define en (i) y (ii) anterior, dichas enzimas preferiblemente se originan de un organismo diferente del microorganismo anfitrión. La modificación genética puede consistir, por ejemplo en integrar los genes correspondientes que codifican las enzimas en el cromosoma, que expresa las enzimas de un plásmido que contiene un promotor en la dirección 5' de la secuencia que codifica la enzima, el promotor y la secuencia codificante preferiblemente originada de diferentes organismos, o cualquier otro método conocido por un experto en la técnica. Alternativamente, otras bacterias o levaduras pueden tener ventajas específicas y se pueden seleccionar. Por ejemplo, una levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae*, una bacteria extremofila tal como *Thermus thermophilus*, o bacteria anaeróbica de la familia *Clostridia*, microalgas, o se pueden utilizar bacterias fotosintéticas.

Los organismos utilizados en la invención pueden ser procariotes o eucariotes, preferiblemente, estos son microorganismos tales como bacterias, levaduras,

hongos o mohos, o células de plantas o células de animal. En una realización particular, los microorganismos son bacterias, preferiblemente del género *Escherichia*, *Alcaligenes* o *Bacillus* e incluso más preferiblemente de las especies *Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus* o *Bacillus megaterium*.

En otra realización preferida, los microorganismos son bacterias recombinantes del género *Escherichia*, preferiblemente de las especies *Escherichia coli*, se han modificado con el fin de producir endógenamente uno o más 3-hidroxicanoatos, y convertirlos a alquenos.

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

En otra realización preferida, el método de acuerdo con la invención hace uso de un microorganismo fotosintético que expresa las enzimas como se especifica en (i) y (ii) anterior. Preferiblemente, el microorganismo es una bacteria fotosintética, o una microalga. Incluso más preferiblemente dicho microorganismo tiene la propiedad natural o artificial de producir endógenamente uno o más 3-hidroxicanoatos. En este caso el microorganismo sería capaz de producir alquenos directamente de CO_2 presente en la solución.

También es concebible utilizar en el método de acuerdo con la invención un microorganismo que produce una enzima como se define en (i) anterior y otro microorganismo que produce una enzima como se define en (ii) anterior. Más aún, en una realización adicional por lo menos uno de los microorganismos es capaz de producir uno o más 3-hidroxicanoatos o, en una realización alternativa, se utiliza un microorganismo adicional en el método que es capaz de producir uno o más 3-hidroxicanoatos.

En otra realización preferida el método de acuerdo con la invención hace uso de un organismo multicelular que expresa las enzimas como se define en (i) y (ii) anterior.

Ejemplos para dichos organismos son plantas o animales.

En una realización particular, el método implica cultivar los microorganismos en condiciones de cultivo estándar (30-37° C a 1 atm, en un fermentador que permite el crecimiento aeróbico de las bacterias) o condiciones no estándar (temperatura mayor para corresponder a las condiciones de cultivo de organismos termófilos, por ejemplo).

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

En otra realización preferida el método de acuerdo con la invención comprende adicionalmente la etapa de recolectar alquenos gaseosos desgasificados de la reacción, es decir recuperar los productos que se desgasifican, por ejemplo, fuera del cultivo. Sin embargo en una realización preferida, el método se lleva a cabo en la presencia de un sistema para recolectar alqueno bajo forma gaseosa durante la reacción.

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

En una realización particular, el método también comprende detectar el alqueno (por ejemplo propileno, etileno o isobutileno) que está presente en la fase gaseosa. La presencia del compuesto que se va a producir en un ambiente de aire u otro gas, incluso en cantidades pequeñas, se puede detectar al utilizar varias técnicas y en particular al utilizar sistemas de cromatografía de gas con detección ionización de llama o infrarroja, o al acoplar con espectrometría de masa.

En una realización particular, se condensan los alquenos producidos por un método de acuerdo con la invención, luego se reducen opcionalmente, al utilizar técnicas conocidas por un experto en la técnica, con el fin de producir alquenos de cadena más larga, o alcanos de cadena larga. Por ejemplo, se puede utilizar isobutileno para sintetizar isooctano: los métodos catalíticos para llevar a cabo exitosamente esta reacción que ya se ha descrito completamente.

En otra realización, el método de acuerdo con la invención se caracteriza por la conversión de una fuente de carbono tal como glucosa, a 3-hidroxiacanoato, seguido por la conversión de dicho 3-hidroxiacanoato en el alqueno correspondiente. Las diferentes etapas de dicho método se bosquejan en la Figura 6.

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

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

La presente invención también se relaciona con un método para producir un alqueno que comprende la etapa de convertir enzimáticamente un 3-fosfoxiacanoato en el alqueno correspondiente mediante el uso de una enzima que puede catalizar la conversión por medio de descarboxilación y desfosforilación.

Con respecto a la enzima preferida que se va a utilizar en dicho método, la misma aplica cuando se ha establecido anteriormente en conexión con (ii) del método de acuerdo con la invención como se describió aquí anteriormente.

Más aún, también con respecto a las otras realizaciones preferidas descritas anteriormente para el método de acuerdo con la invención, lo mismo aplica al método para producir un alqueno de un 3-fosfoxiacanoato.

La presente invención también se relaciona con organismos, preferiblemente microorganismos, que producen por lo menos dos enzimas, en donde una enzima se selecciona de (i) como se especificó anteriormente y la otra enzima se selecciona de (ii) como se especificó anteriormente. En una realización preferida dicho organismo es un organismo recombinante en el sentido que se modifica genéticamente debido a la introducción de por lo menos una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos una de las enzimas mencionadas anteriormente. Preferiblemente dicha molécula de ácido nucleico es heteróloga con respecto al organismo lo que significa que no ocurre en forma natural en dicho organismo.

Sin embargo, la presente invención también se relaciona con un organismo, preferiblemente un microorganismo, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima como se define en (i) anterior y que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima como se define en (ii) anterior. En una realización preferida por lo menos una de las moléculas de ácido nucleico es heteróloga al organismo lo que significa que no ocurre en forma natural en dicho organismo. El microorganismo es preferiblemente una bacteria, una levadura o un hongo. En otra realización preferida el organismo es una planta o animal diferente a humano. Con respecto a otras realizaciones preferidas, lo mismo aplica como se ha establecido anteriormente en relación con el método de acuerdo con la invención.

Más aún, la presente invención también se relaciona con una composición que comprende un microorganismo de acuerdo con la presente invención, un medio de cultivo adecuado y un compuesto 3-hidroxiálcanoato o una fuente de carbono que se puede convertir mediante el microorganismo a un compuesto 3-hidroxiálcanoato.

La presente invención también se relaciona con el uso de una combinación de por lo menos dos enzimas, en donde una enzima se selecciona del siguiente (i) y la otra enzima se selecciona del siguiente (ii) o de un organismo, preferiblemente un microorganismo, de acuerdo con la invención o de una composición de acuerdo con la invención, para producir compuestos alqueno de 3-hidroxiálcanoatos, en donde (i) y (ii) son como sigue:

- (i) una primera enzima que tiene una actividad para convertir el 3-hidroxiálcanoato en el 3-fosfonoálcanoato; y
- (ii) una segunda enzima que es diferente de la primera enzima y tiene una actividad

para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno.

Con respecto a las realizaciones preferidas de los diferentes componentes mencionados, lo mismo aplica como se ha establecido anteriormente en relación con el método de acuerdo con la invención.

Otros aspectos y ventajas de la invención se describirán en los siguientes ejemplos, que se dan para propósitos de ilustración y no por vía de limitación.

Leyendas de las Figuras

- Figura 1: El motivo 3-hidroxiisovalerato.
- Figura 2: Reacción catalizada por descarboxilasa mevalonato difosfato.
- Figura 3: Ejemplos de 3-hidroxiisovaleratos.
- Figura 4: Producción de alquenos de 3-hidroxiisovaleratos al combinar dos etapas enzimáticas.
- Figura 5: Cofactores que se pueden utilizar en la reacción para el propósito de complementación estructural en el sitio catalítico de descarboxilasa mevalonato difosfato.
- Figura 6: Método integrado para producir un alqueno de glucosa.
- Figura 7: Detección de descarboxilasas MDP en un ensayo de complementación. La reacción catalizada por la enzima *P. torridus* sola (0.1 mg) sin una segunda enzima, se toma como referencia.
- Figura 8: Efecto combinado de enzimas descarboxilasa MDP de *P. torridus* y *S. gordonii* para convertir 3-hidroxiisovalerato (VIH) en isobuteno (IBN). Se mide la producción IBN como una función de la concentración de descarboxilasa MDP *S. gordonii* agregada a una mezcla de reacción pre-incubada de VIH con 100 µg de descarboxilasa MDP *P. torridus*.
- Figura 9: Detección de homólogos de enzima de descarboxilasa MDP *S. gordonii*.

El área pico de isobuteno obtenido para la reacción con la enzima Th. acidophilum (0.1 mg) sola (sin segunda enzima), se utiliza como referencia (relación=1).

Las descarboxilasas MDP del género streptococcus son particularmente eficientes cuando se utilizan en combinación con una enzima del P. torridus phylum.

Figura 10: Esquema del ensayo de cuantificación ADP, monitoreando el consumo de NADH mediante la reducción de absorbancia a 340 nm.

Figura 11: Gráfica de velocidad como una función de concentración de sustrato para la reacción fosfotransferasa catalizada por descarboxilasa MDP P. torridus. Se computan índices iniciales de las cinéticas durante los primeros 30 minutos de la reacción.

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

Sin enzima

En la presencia de descarboxilasa MDP S. mitis

En la presencia de descarboxilasa MDP Th. acidophilum

En la presencia de ambas enzimas Th. acidophilum y S. mitis.

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

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

Ensayos:

1. Sin enzima, 0 mM ATP
2. 2 mg/ml de enzima, 0 mM ATP
3. Sin enzima, 10 mM ATP
4. 2 mg/ml de enzima, 10 mM ATP

Los siguientes Ejemplos sirven para ilustrar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación, expresión y purificación de una colección de

descarboxilasa MDP

Una colección de 55 genes que codifican los representantes de la familia descarboxilasa difosfomevalonato (descarboxilasa MDP) a través de organismos eucarióticos, procarióticos y arqueal se construye y se prueba para identificar la mayoría de candidatos activos para mejorar la producción de isobuteno (IBN).

Clonación, cultivos bacterianos y expresión de proteínas.

Los genes que codifican la descarboxilasa mevalonato difosfato (MDP) EC 4.1.1.33 se clonan en el vector pET 25b (Novagen) en el caso de genes eucarióticos y en pET 22b (Novagen) en el caso de genes procarióticos. Una resistencia de 6 codones de histidina se inserta después del codón de inicio de metionina para proporcionar una etiqueta de afinidad para purificación. Se transforman células *E. coli* competentes BL21(DE3) (Novagen) con estos vectores de acuerdo con el procedimiento de choque térmico. Las células transformadas se cultivan con agitación (160 rpm) en medio de auto-inducción ZYM-5052 (Studier FW, *Prot.Exp.Pur.* 41, (2005), 207-234) durante 6h a 37° C y se continua la expresión de proteína a 28° C durante la noche (aproximadamente 16 h). Las células se recolectan mediante centrifugación a 4° C, 10,000 rpm durante 20 min y los gránulos se congelan a -80° C.

Purificación y concentración de proteína.

Los gránulos de 200 ml de células de cultivo se descongelan en hielo y se resuspenden en 5 ml de Na₂HPO₄ pH 8 que contiene 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ y 1 mM DTT. Se agregan veinte microlitros de lisonasa (Novagen). Las células se incuban 10 minutos a temperatura ambiente y luego devuelta al hielo durante 20 minutos. Se completa la lisis celular mediante sonicación durante 3 x 15 segundos. Los extractos bacterianos luego se clarifican mediante centrifugación a 4° C, 10,000 rpm durante 20 min. Los lisados bacterianos clarificados se cargan en columna PROTINO-1000 Ni-TED (Macherey-Nagel) permitiendo la adsorción de proteínas etiquetadas 6-His. Las columnas se lavan y las enzimas de interés se eluyen con 4 ml de 50 mM Na₂HPO₄ pH 8 que contiene 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 250 mM imidazol. Luego se concentran eluados y se desalinizan en unidad de filtro Amicon Ultra-4 10 kDa (Millipore) y se resuspenden en 0.25 ml 50 mM Tris-HCl pH 7.4 que contiene 0.5 mM DTT y 5 mM MgCl₂. Las concentraciones de proteína se

cuantifican de acuerdo con el método Bradford. La pureza de las proteínas así purificadas varía de 40 % a 90 %.

Ejemplo 2: Detección de la colección de descarboxilasa MDP.

Se evalúan las descarboxilasas MDP utilizando un ensayo de complementación. Se incuban descarboxilasa MDP *P. torridus* con cada enzima probada de la colección.

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

50 mM Tris HCl pH 7,0

10 mM MgCl₂

20 mM KCl

40 mM ATP

50 mM 3-hidroxiisovalerato (VIH)

El pH se ajusta a 7.0

Se agregan 100 µg de la descarboxilasa MDP de *P. torridus* y 1 mg de la descarboxilasa MDP que se va a probar a 1 ml de mezcla de reacción. Una mezcla de reacción que contiene solo 100 µg de descarboxilasa MDP *P. torridus* se utiliza como referencia. La mezcla luego se incubó sin agitación a 45° C durante 90h en un frasco sellado (Interchim).

Se recolecta un ml de la fase gaseosa y se inyecta en un cromatógrafo de gas HP5890 (HP) equipado con un detector FID y una columna CP SilicaPlot (Varian). Se utiliza como referencia isobuteno comercial.

Este procedimiento de detección conduce a la identificación de varias enzimas de descarboxilasa MDP que aumentan el índice de producción de isobuteno. Como se muestra en la Figura 7, se observa una producción mayor de isobuteno para las siguientes descarboxilasas MDP.

Candidato 1:

Número de acceso Genbank: CAI97800

Número de acceso SwissProt/TrEMBL : Q1GAB2

Organismo: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842

Candidato 2:

Número de acceso Genbank: AAC50440.1

Número de acceso SwissProt/TrEMBL : P53602.1

Organismo: Homo sapiens

Candidato 3:

Número de acceso Genbank: ABV09606

Número de acceso SwissProt/TrEMBL: A8AUU9

Organismo: Streptococcus gordonii str. Challis substr. CH1

La mayor producción de isobuteno se observa con descarboxilasa MDP purificada de Streptococcus gordonii.

Esto indica que las dos enzimas presentes en el ensayo (uno de P. torridus y el otro de S. gordonii) se realizan complementariamente en dos etapas de reacción que producen IBN de VIH: transferencia del grupo fosforilo terminal de ATP para el oxígeno C3 de 3-hidroxiisovalerato seguido por desfosforilación-descarboxilación combinada del intermedio 3-fosfonoxiisovalerato.

Ejemplo 3: Efecto de concentración de enzima en redimiento de producción de isobuteno.

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

50 mM Tris-HCl pH 7,0

10 mM MgCl₂

20 mM KCl

40 mM ATP

50 mM 3-hidroxiisovalerato (VIH)

El pH se ajusta a 7,0

Se agregan 100 µg de descarboxilasa MDP de P. torridus y una cantidad variada (de 0 a 1 mg) de descarboxilasa MDP purificada de Streptococcus gordonii a 1 ml de la mezcla de reacción. La mezcla luego se incuba sin agitación a 45° C durante 90h en un frasco sellado (Interchim).

Se recolecta un ml de la fase de espacio superior y se inyecta en un cromatógrafo de gas HP5890 (HP) equipado con un detector FID y una columna de CP SilicaPlot (Varian). Se utiliza como referencia isobuteno comercial.

El aumento de la concentración de enzima *S. gordonii* resulta en un aumento de la cantidad de isobuteno producido (Figura 8).

Ejemplo 4: Detección de una colección de homólogos *descarboxilasa MDP Streptococcus gordonii*.

Utilizando el programa en línea BLAST alojado por NCBI, se buscan secuencias contra la base de datos de secuencia de proteína no redundante para generar una lista de enzimas con alta similitud de secuencia (> 40% de identidad para la enzima *Streptococcus gordonii*. La lista resultante incluye 18 candidatos.

Microorganismos	% de identidad con <i>descarboxilasa MDP de Streptococcus gordonii</i>	Número de acceso Genbank
<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 35037	75	EFE56694.1
<i>Leptotrichia goodfellowii</i> F0264	61	EEY36155.1
<i>Carnobacterium</i> sp. AT7	40	EDP67928.1
<i>Enterococcus faecium</i> TX1330	40	EEI60970.1
<i>Staphylococcus aureus</i> JH1	40	ABR51487.1
<i>Streptococcus agalactiae</i> NEM316	70	CAD47054.1
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	71	AAN58642.1
<i>Streptococcus uberis</i> 0140J	71	CAR41735.1
<i>Streptococcus infantarius</i> subsp	71	EDT48420.1
<i>Streptococcus gallolyticus</i> UCN34	71	CBI13757.1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp <i>equisimilis</i> GGS_124	71	BAH81333.1
<i>Streptococcus</i> sp. M143	76	EFA24040.1

Streptococcus salivarius SK126	74	EEK09252.1
Streptococcus suis 89/1591	40	EEF63672.1
Streptococcus parasanguinis ATCC 15912	73	EFH19018.1
Streptococcus sanguinis SK36	98	ABN43791.1
Streptococcus sp. 2_1_36FAA	98	EEY81027.1
Streptococcus mitis B6	74	CBJ22986.1

Las secuencias de las enzimas descarboxilasa MDP infrarojas de los genomas de las especies anteriores así como también del genoma de *S. gordonii* se generan mediante concatenación de oligonucleótido para ajustar el uso de codón de *E. coli*. Se inserta una resistencia de 6 codones de histidina después del codón de inicio de metionina para proporcionar una etiqueta de afinidad para purificación. Los genes así sintetizados se clonan en un vector de expresión pET25b (los vectores se construyen por GENEART AG). Después de la transformación de la cepa *E. coli* BL21(DE3), las proteínas se producen de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las enzimas luego se ensayan utilizando el método descrito en el Ejemplo 2, utilizando descarboxilasa MDP *Th. acidophilum* en lugar de la enzima *P. torridus*. Este procedimiento de detección conduce a la identificación de enzimas más eficientes para la producción de isobuteno que la enzima *S. gordonii* (Figura 9), en particular descarboxilasa MDP de *S. infantarius*, *S. gallolyticus*, *S. sp. M143*, *S. salivarius*, *S. suis*, *S. sanguinis* y *S. mitis*.

Ejemplo 5: Caracterización de la actividad fosfotransferasa.

La liberación de ADP que se asocia con la producción de IBN de VIH se cuantifica utilizando el ensayo acoplado con deshidrogenasa piruvato quinasa/lactato (Figura 10). Las descarboxilasas MDP de *P. torridus*, *Th. acidophilum*, *S. infantarius*, *S. mitis* se evalúan por su capacidad de fosforilar VIH, liberando ADP.

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

- 50 mM Tris-HCl pH 7,0
- 10 mM MgCl₂
- 100 mM KCl

- 5 mM ATP
- 0,2 mM NADH
- 0,5 mM Fosfoenolpiruvato
- 3 U/ml Deshidrogenasa lactato
- 1,5 U/ml quinasa Piruvato
- 0-50 mM 3-Hidroxiisovalerato (VIH)
- El pH se ajusta a 7,0

Cada ensayo se inicia mediante la adición de la enzima particular (en una concentración de 0.05 a 1 mg/ml) y se supervisa la desaparición de NADH mediante la siguiente absorbancia a 340 nM.

Los ensayos con descarboxilasas MDP de *P. torridus* phylum como también del

Organismo	K_M , mM	k_{cat} , seg^{-1}	$k_{cat}/K_M \times 10^{-3}$, $\text{mM}^{-1} \text{seg}^{-1}$
Thermoplasma acidophilum	4.02	0.26	60
Picrophilus torridus	9.17	0.19	20
Streptococcus mitis	12.1	0.04	3
Streptococcus infantarius	13.4	0.03	2

género *Estreptococcus* surge como un aumento reproducible en la producción de ADP en la presencia de VIH. La Figura 11 muestra un ejemplo de una gráfica Michaelis–Menten que corresponde a los datos recolectados para la enzima *P. torridus*. Los parámetros cinéticos se muestran en la siguiente Tabla.

Las enzimas del *P. torridus* phylum exhiben mayores actividades fosfotransferasa que aquellas del género *Estreptococcus*.

Ejemplo 6: Producción de Isobuteno de 3-hidroxiisovalerato al combinar dos enzimas.

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

- 50 mM Tris HCl pH 7,5
- 10 mM MgCl_2
- 20 mM KCl

40 mM ATP

50 mM VIH

El pH se ajusta a 7,5

Se agregan 100 µg de descarboxilasa MDP de *Th. acidophilum* y 500 µg de descarboxilasa MDP de *S. mitis* a 1 ml de la mezcla de reacción. Las reacciones de control con solo una de las dos enzimas se corren en paralelo. Los ensayos se incuban sin agitación a 37° C en un frasco sellado (Interchim).

La producción de IBN se mide al analizar muestras de alícuotas durante un periodo de incubación de 142 horas.

Se recolecta y se inyecta un ml de la fase gaseosa en un cromatógrafo de gas HP5890 (HP) equipado con un detector FID y una columna de CP SilicaPlot (Varian). Se utiliza como referencia isobuteno comercial.

Las cinéticas de producción de isobuteno se muestran en la Figura 12. La descarboxilasa MDP de *Th. acidophilum* cataliza la producción de isobuteno de VIH. La adición de descarboxilasa MDP de *S. mitis* conduce a un aumento de 3 veces de la producción de isobuteno después de 142 h de incubación.

La descarboxilasa MDP de *S. mitis* solo produce pequeñas cantidades de isobuteno después de 6 días de incubación, que indica una actividad baja de fosfotransferasa.

La producción de isobuteno así se puede aumentar al combinar dos tipos de enzimas que realizan complementariedad de las dos etapas de reacción.

Ejemplo 7: Efecto de ATP en producción de isobuteno de 3-fosfonoxiisovalerato (PIV).

El compuesto 3-fosfonoxiisovalerato (PIV) se sintetiza químicamente a partir de 3-hidroxiisovalerato de acuerdo con el esquema descrito en la Figura 13 por SYNTHEVAL (Francia).

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

50 mM Tris-HCl pH 7,5
 10 mM MgCl₂
 20 mM KCl
 0 mM ATP (ensayo №1 y №2)
 10 mM ATP (ensayo №3 y №4)
 25 mM 3-fosfonoxiisovalerato
 El pH se ajusta a 7.5

La reacción se inicia mediante la adición de 2 mg de descarboxilasa MDP purificada de *S. mitis* a 0.5 ml de la mezcla de reacción. Las reacciones de control se corren en ausencia de la enzima (ensayos №1 y №3).

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

Se recolecta y se inyecta un ml de la fase gaseosa en un cromatógrafo de gas Varian 430-GC equipado con un detector FID y una columna de CP SilicaPlot (Varian). Se utiliza como referencia isobuteno comercial.

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

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

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

50 mM Tris-HCl pH 7,5
 10 mM MgCl₂
 50 mM KCl
 40 mM ATP
 0-100 mM 3-fosfonoxiisovalerato
 El pH se ajusta a 7,5

La reacción se inicia mediante la adición de 1 mg de descarboxilasa MDP purificada de *S. mitis* a 0.5 ml de la mezcla de reacción. La mezcla luego se incuba sin

agitación a 37° C durante 44 h en un frasco sellado de 2 ml (Interchim).

Se recolecta y se inyecta un ml de la fase gaseosa en un cromatógrafo de gas Varian 430-GC equipado con un detector FID y una columna de CP SilicaPlot (Varian). Se utiliza como referencia isobuteno comercial.

Los ensayos con descarboxilasa MDP de *S. mitis* muestran un aumento de 160-400 veces en producción IBN durante el nivel de fondo (descomposición espontánea de 3-fosfonoxiisovalerato) en la presencia de ATP como co-factor (véase la siguiente Tabla).

Concentración PIV, mM	Área pico, unidades arbitrarias	
	Sin enzima	2 mg/ml de enzima
25	164,9	26945,2
50	328,7	65720,4
75	561,5	239249,2
100	2078,7	339363,7

Se encuentra que la descarboxilasa MDP de *S. mitis* tiene un K_M mayor de 60 mM y un k_{cat} de por lo menos $1.3 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un alqueno, caracterizado porque este comprende la conversión de un 3-hidroxialcanoato en dicho alqueno mediante
 - (i) una primera enzima que tiene una actividad para convertir el 3-hidroxialcanoato en el 3-fosfonoxialcanoato; y
 - (ii) una segunda enzima que es diferente de la primera enzima y tiene una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno.
2. El método de la reivindicación 1 en donde
 - (i) la primera enzima que tiene una actividad para convertir el 3-hidroxialcanoato en el 3-fosfonoxialcanoato se selecciona del grupo que consiste de
 - (A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y muestra una actividad para convertir el 3-hidroxialcanoato en el 3-fosfonoxialcanoato que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1;
 - (B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y muestra una actividad para convertir el 3-hidroxialcanoato en el 3-fosfonoxialcanoato que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2;
 - (C) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 3 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 y muestra una actividad para convertir el 3-hidroxialcanoato en el 3-fosfonoxialcanoato que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; y

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

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde

- (ii) la segunda enzima tiene una actividad para convertir dicho 3-fosfonoacanoato en dicho alqueno seleccionado del grupo que consiste de
 - (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoacanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5;
 - (b) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoacanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6;
 - (c) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 7 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoacanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7;

- (d) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 8 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8;
- (e) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 9 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9
- (f) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 10 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10;
- (g) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 11 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11;
- (h) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 12 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato

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

- (i) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 13 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13;
- (j) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 14 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14; y
- (k) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 15 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 15 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 15.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la etapa de convertir 3-hidroxipropionato a etileno.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la etapa de convertir 3-hidroxibutirato a propileno.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la etapa de convertir 3-hidroxisvalerato a 1-butileno.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la etapa de convertir 3-hidroxi-3-metilbutirato a isobutileno.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la etapa de convertir 3-hidroxi-3-metilvalerato a isoamileno.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones previas, caracterizado porque la etapa de conversión se lleva a cabo *in vitro*, en un sistema libre de célula.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones previas caracterizado porque el método se lleva a cabo en la presencia de un microorganismo que produce dichas enzimas como se define en (i) y (ii) de la reivindicación 1.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones previas, caracterizado por el uso de un organismo multicelular que produce dichas enzimas como se define en (i) y (ii) de la reivindicación 1.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, que comprende una etapa de recolectar alquenos gaseosos desgasificados de la reacción.
13. Un organismo multicelular o un microorganismo que produce por lo menos dos enzimas, en donde una enzima se selecciona de (i) y la otra enzima se selecciona de (ii), en donde (i) y (ii) son como sigue:
 - (i) una primera enzima que tiene una actividad para convertir el 3-hidroxi-3-metilbutirato en el 3-fosfonoxialcanoato; y
 - (ii) una segunda enzima que es diferente de la primera enzima y tiene una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno.
14. Una composición que comprende el microorganismo de la reivindicación 13, un medio de cultivo adecuado y un compuesto 3-hidroxi-3-metilbutirato o una fuente de carbono que se puede convertir mediante el microorganismo en un compuesto 3-hidroxi-3-metilbutirato.
15. Uso de una combinación de por lo menos dos enzimas, en donde una enzima

se selecciona del siguiente (i) y la otra enzima se selecciona del siguiente (ii) o de un microorganismo de la reivindicación 13 o de una composición de la reivindicación 14, para producir compuestos alqueno de 3-hidroxialcanoatos,

en donde (i) y (ii) son como sigue:

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

16. El uso de la reivindicación 14, en donde

- (i) la primera enzima que tiene una actividad para convertir el 3-hidroxialcanoato en el 3-fosfonoxialcanoato se selecciona del grupo que consiste de
 - (A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y muestra una actividad para convertir el 3-hidroxialcanoato en el 3-fosfonoxialcanoato que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1;
 - (B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y muestra una actividad para convertir el 3-hidroxialcanoato en el 3-fosfonoxialcanoato que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2;
 - (C) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 3 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 y muestra una actividad para convertir el 3-hidroxialcanoato en el 3-fosfonoxialcanoato que es por lo menos tan alta como la actividad

correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; y

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

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

- (ii) la segunda enzima tiene una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxiacanoato en dicho alqueno seleccionado del grupo que consiste de
 - (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxiacanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5;
 - (b) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxiacanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6;
 - (c) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 7 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxiacanoato en

dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7;

- (d) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 8 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8;
- (e) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 9 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9;
- (f) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 10 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10;
- (g) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 11 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11;
- (h) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 12 o una proteína que comprende

una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12;

- (i) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 13 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13;
- (j) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 14 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14; y
- (k) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 15 o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 15% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 15 y muestra una actividad para convertir dicho 3-fosfonoxialcanoato en dicho alqueno que es por lo menos tan alta como la actividad correspondiente de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 15.

- 18.** Un método para producir un alqueno que comprende la etapa de convertir enzimáticamente un 3-fosfonoxialcanoato en el alqueno correspondiente mediante el uso de una enzima que puede catalizar la conversión por medio de descarboxilación y desfosforilación.

19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o el método de la reivindicación 18, caracterizado porque el método se lleva a cabo con ATP, dATP, ADP, AMP, un NTP diferente a ATP, a dNTP o pirofosfato como co-sustrato.

RESUMEN

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

1/13

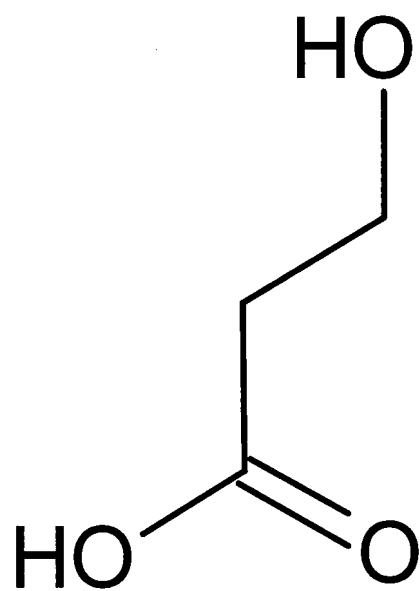


Figura 1

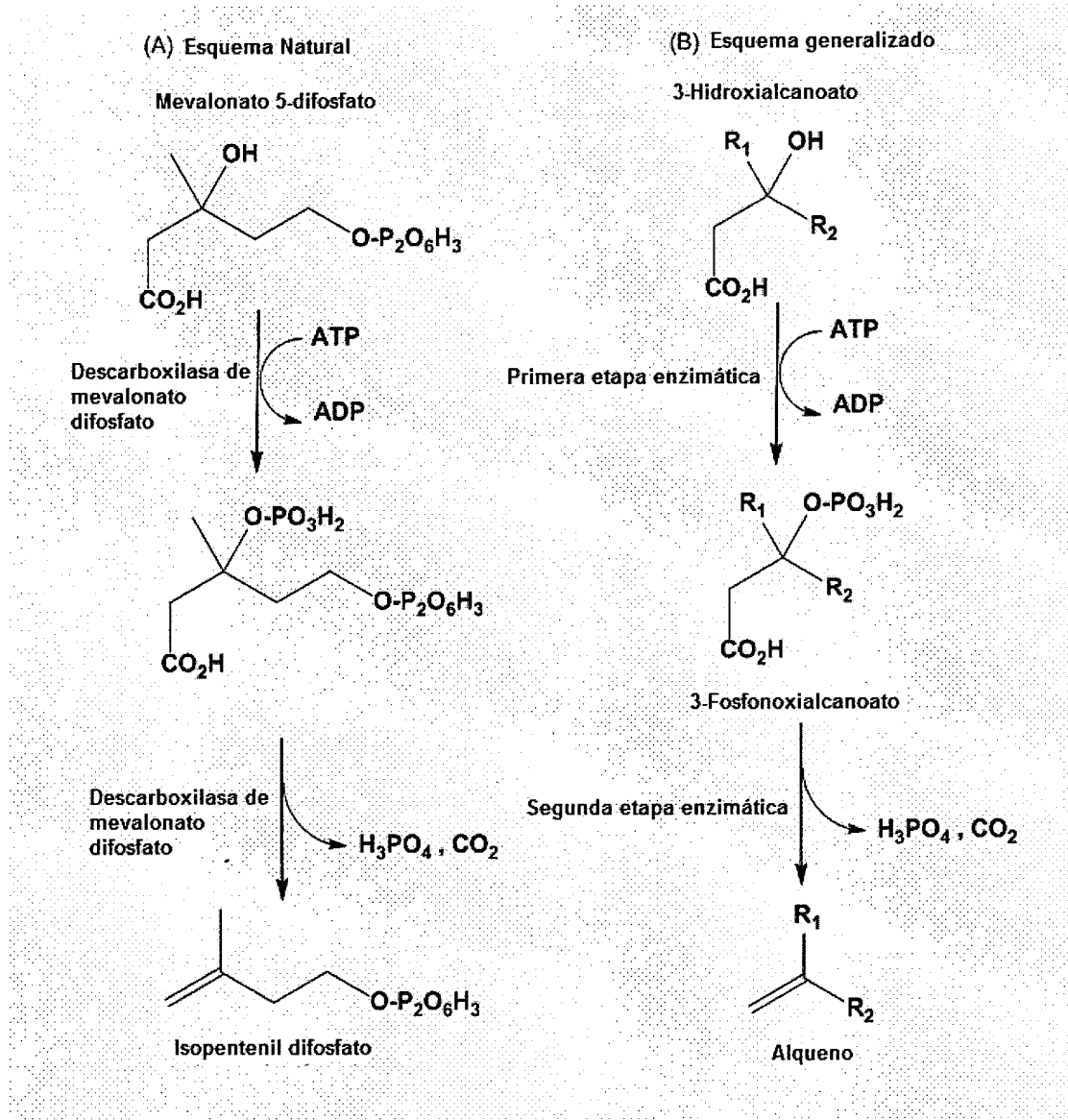
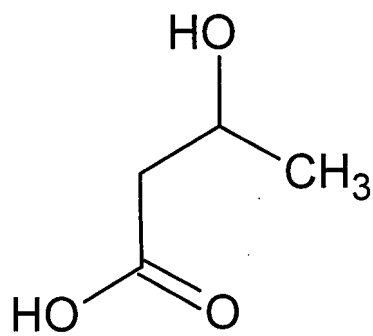
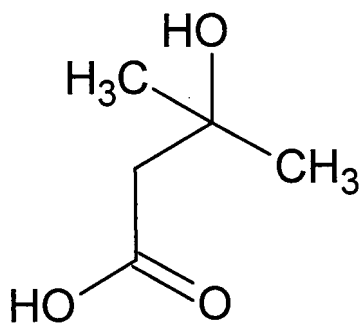


Figura 2

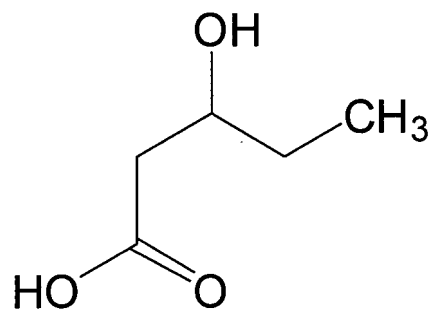
Reacción catalizado por descarboxilasa de mevalonato difosfato EC 4.1.1.33



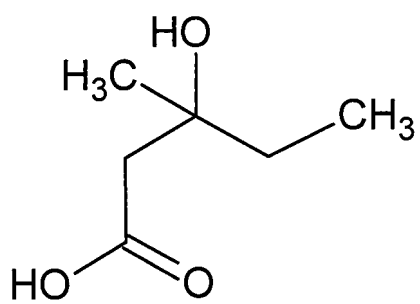
3-hidroxibutirato



3-hidroxi-3-metilbutirato



3-hidroxivalerato



3-hidroxi-3-metilvalerato

Figura 3

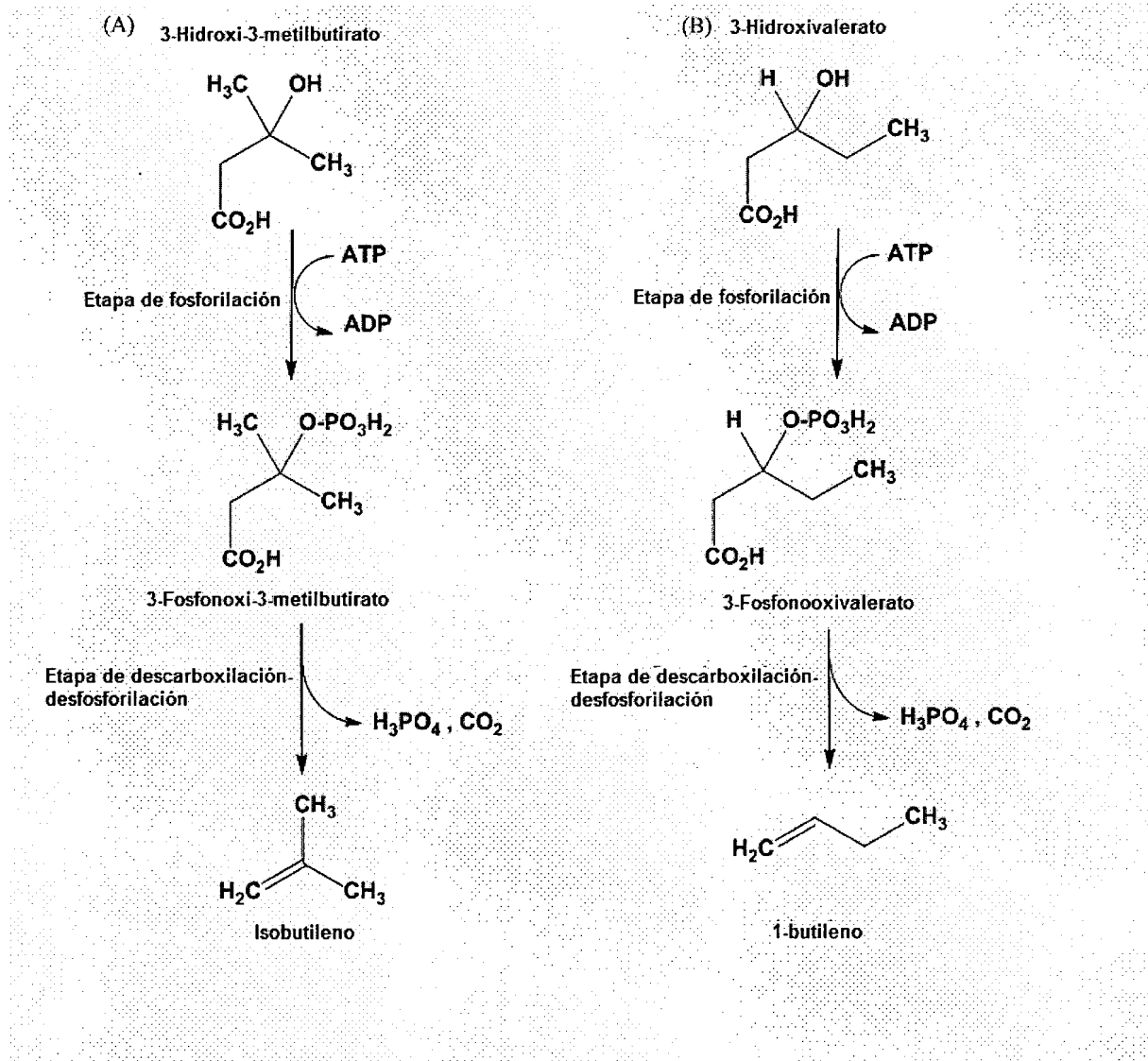


Figura 4

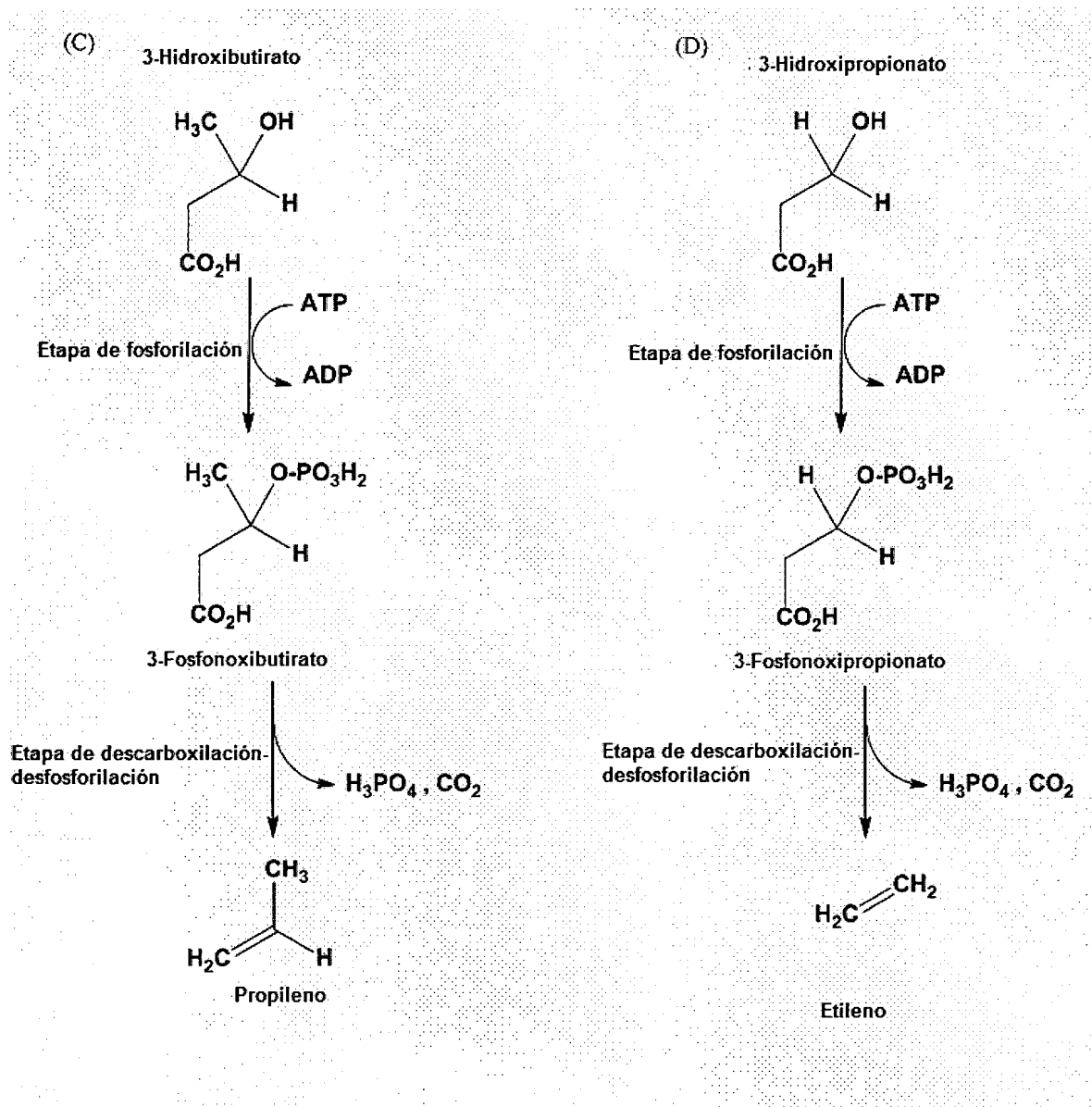


Figura 4 (cont.)

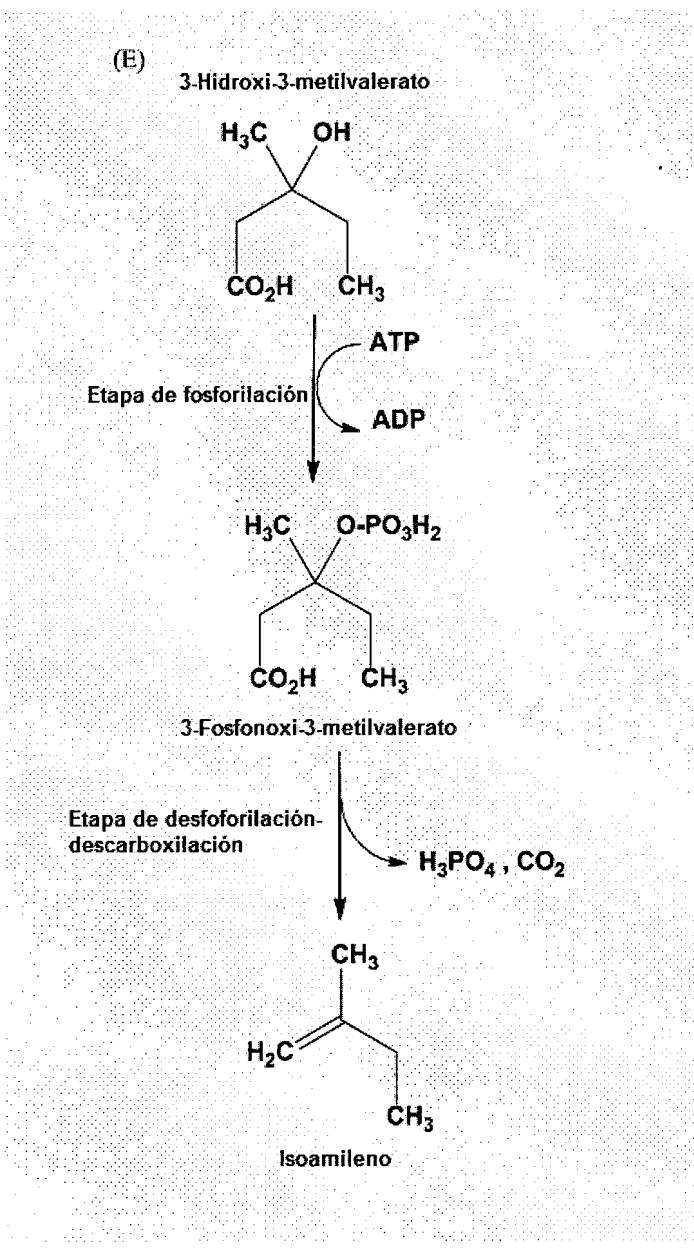
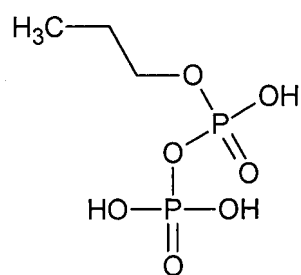
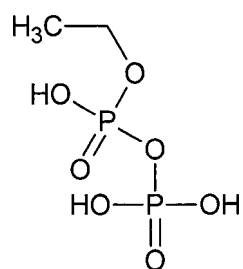


Figura 4 (cont.)

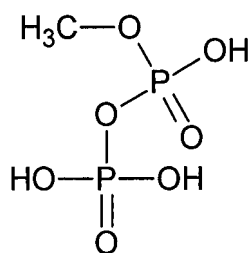
7/13



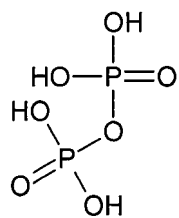
Propanol difosfato



Etanol difosfato



Metanol difosfato



Pirofosfato

Figura 5

8/13

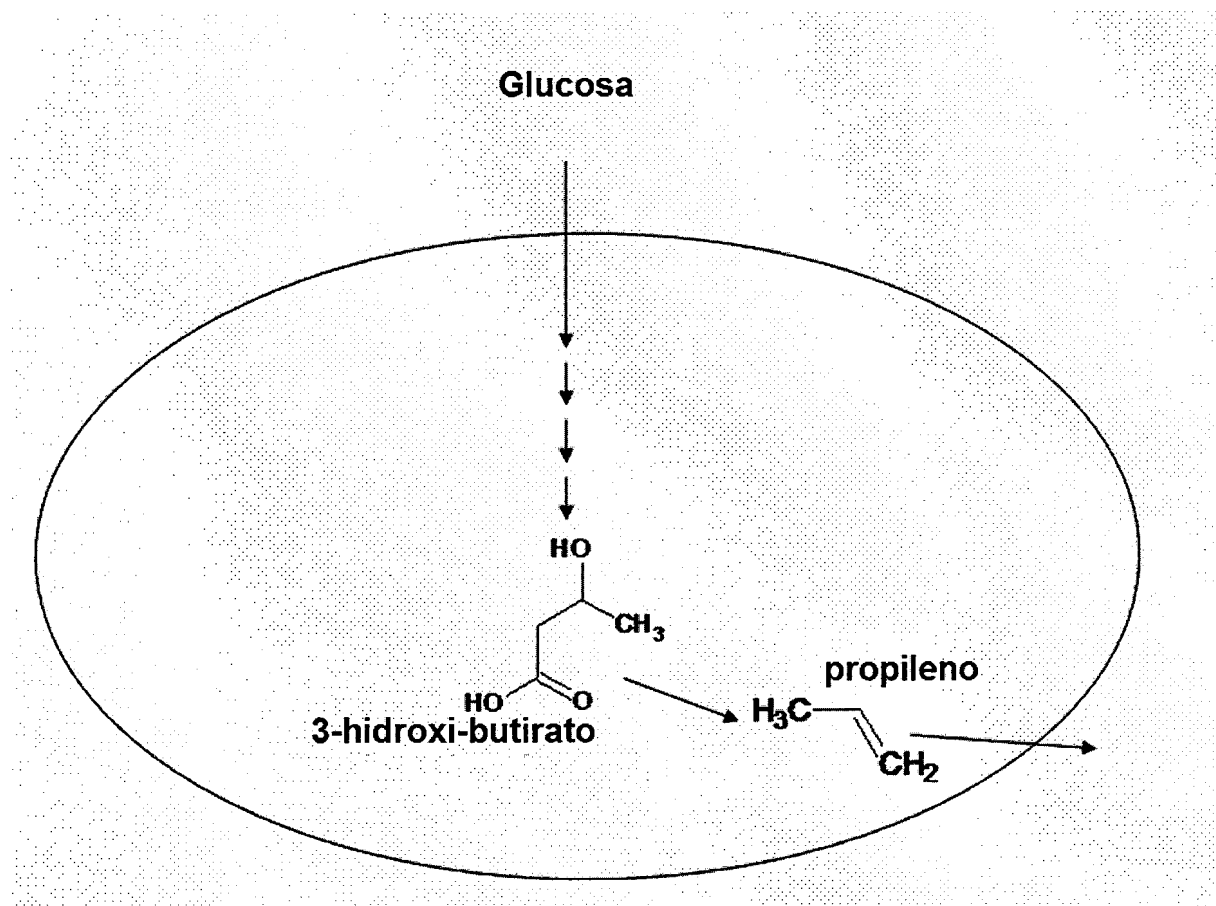


Figura 6

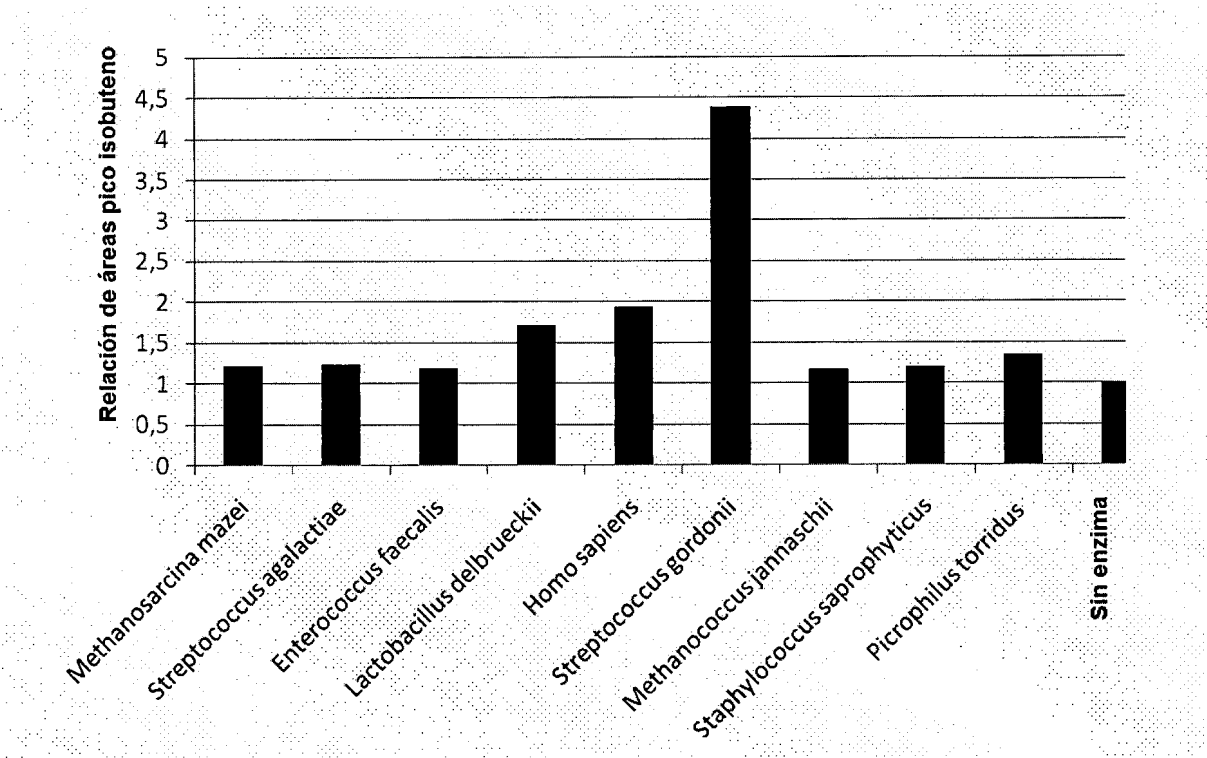


Figura 7

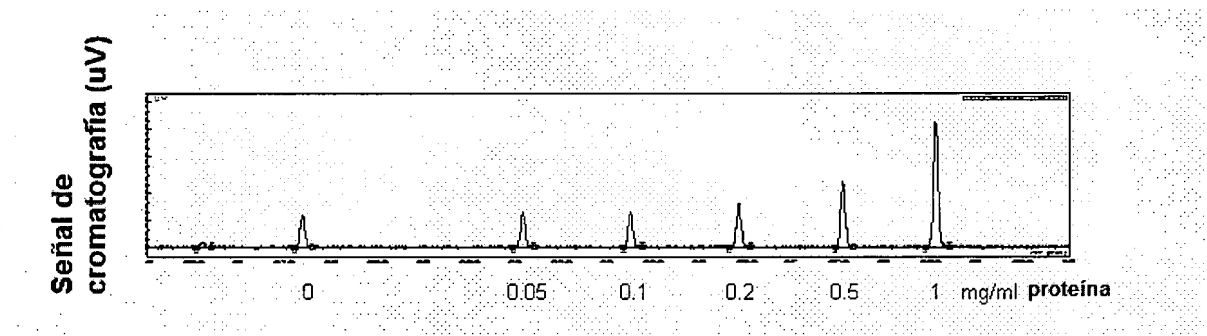


Figura 8

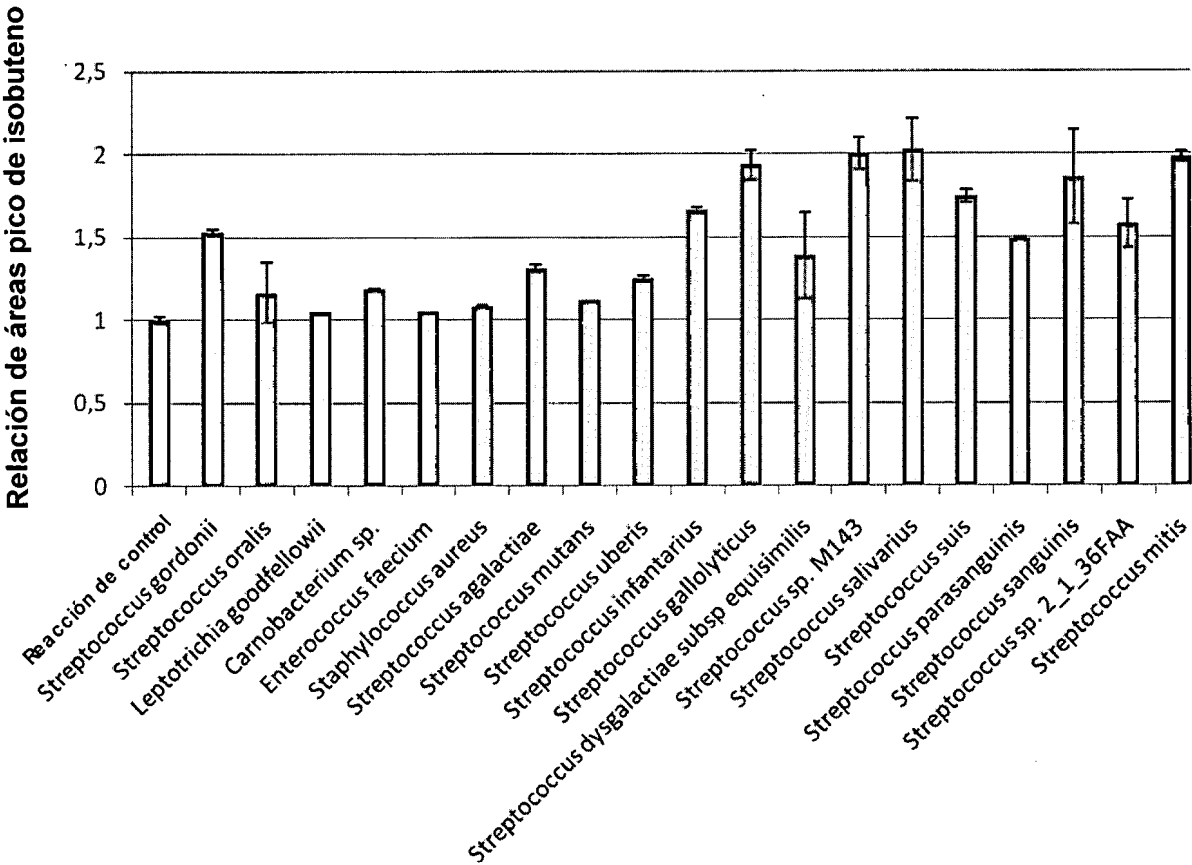


Figura 9

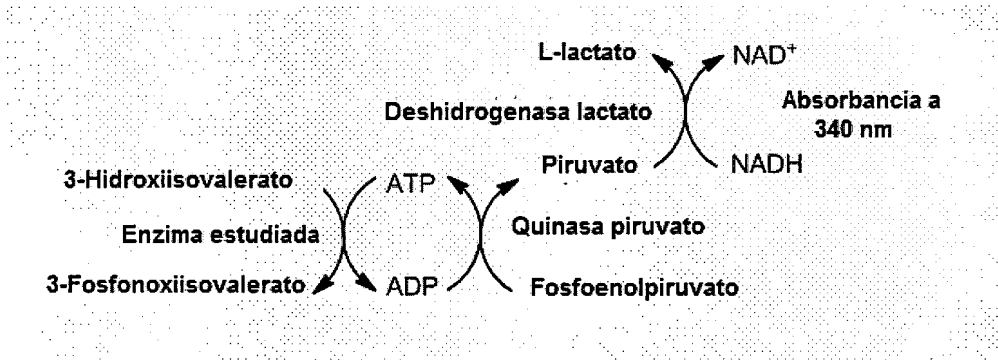


Figura 10

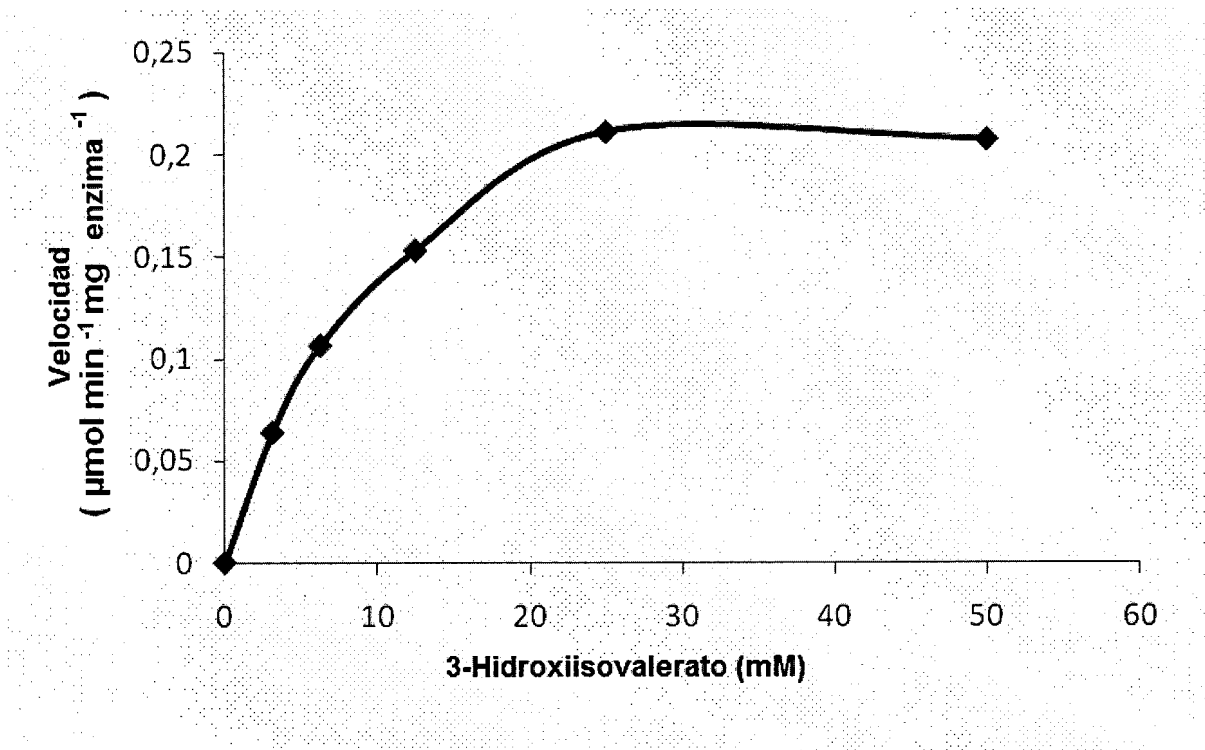


Figura 11

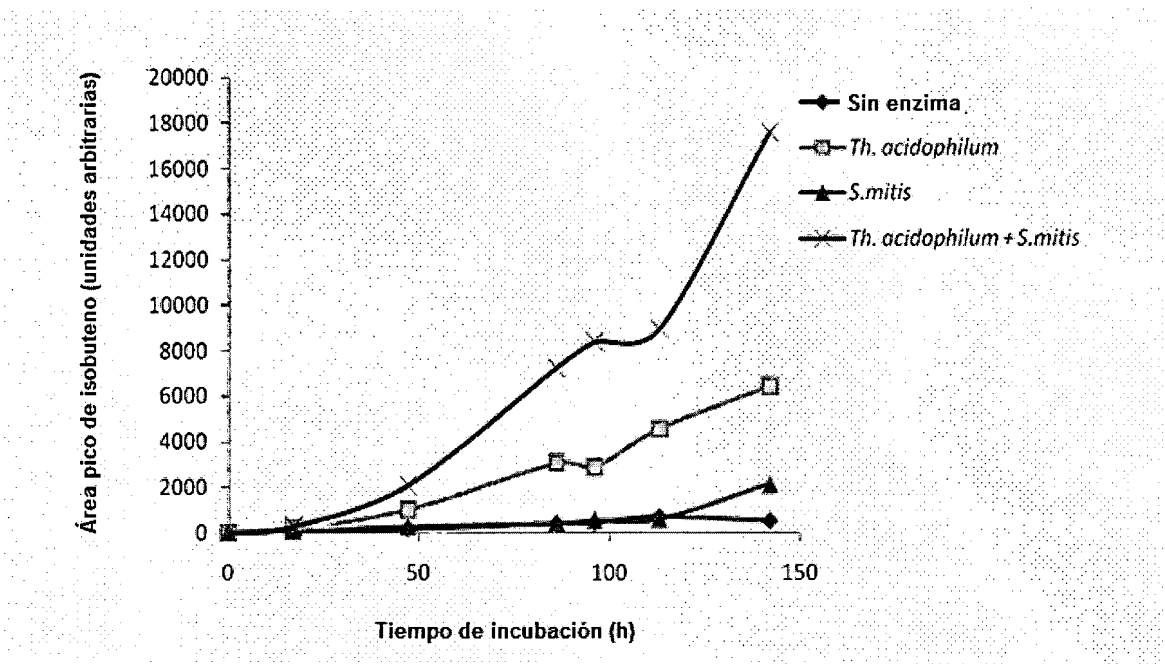


Figura 12

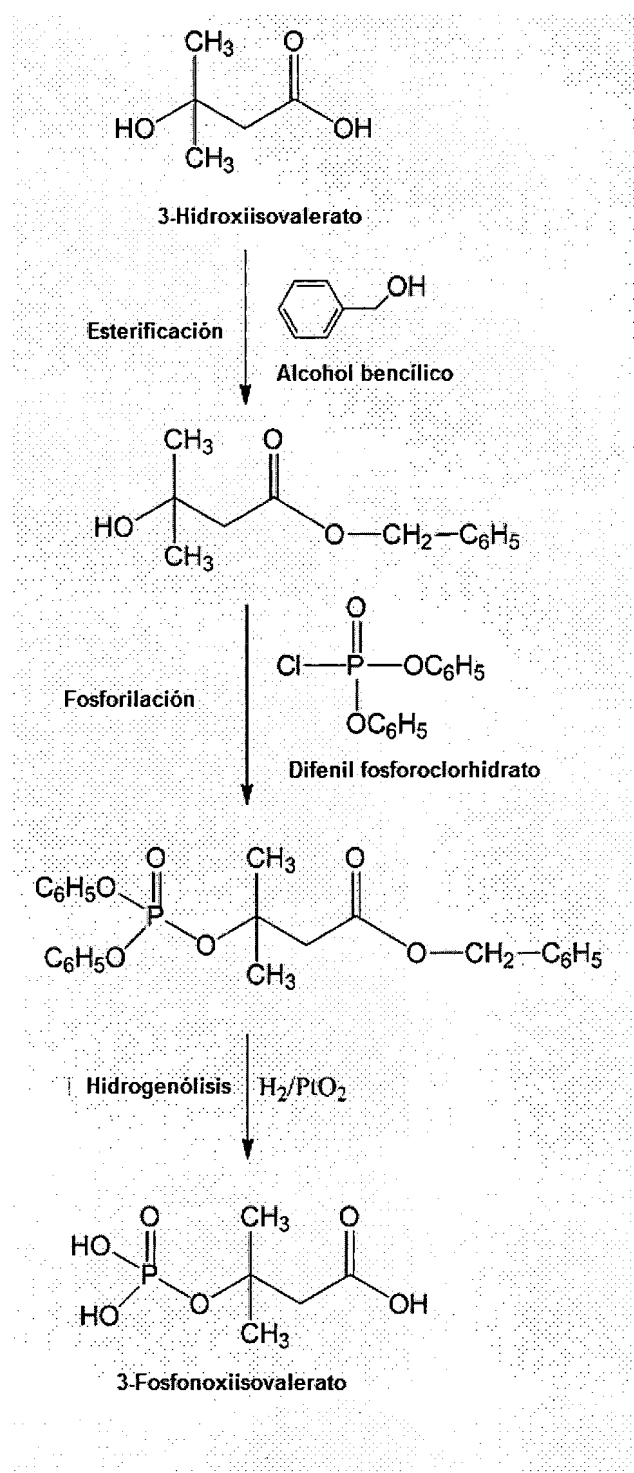


Figura 13

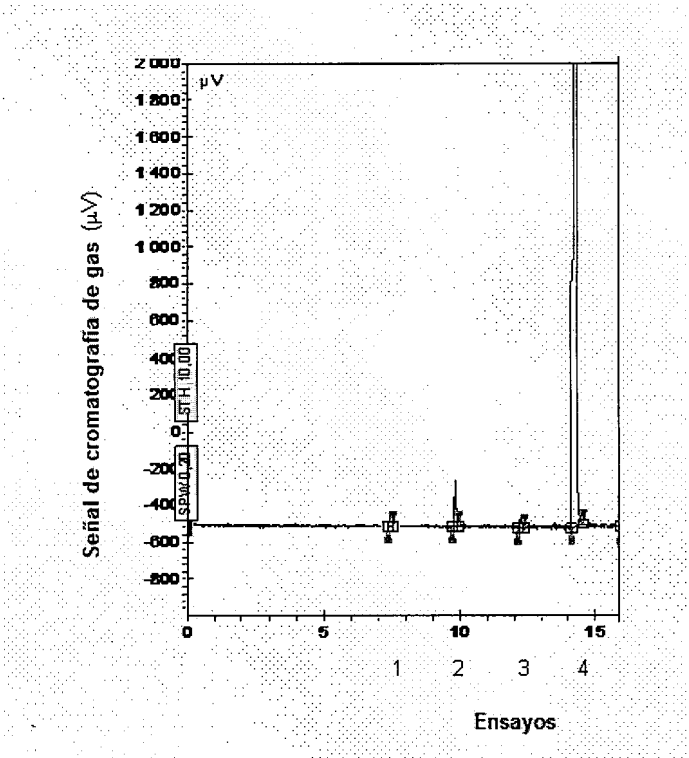


Figura 14

Sequence listing Colo 841 001 9
SEQUENCE LISTING

<110> Global Bioenergies SA et al.
<120> Method for producing terminal alkenes
<130> S1768 PCT S3
<150> EP 10 18 8001.1
<151> 2010-10-19
<160> 15
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 324
<212> PRT
<213> *Picrophilus torridus*
<400> 1
Met Glu Asn Tyr Asn Val Lys Thr Arg Ala Phe Pro Thr Ile Gly Ile
1 5 10 15
Ile Leu Leu Gly Gly Ile Ser Asp Lys Lys Asn Arg Ile Pro Leu His
20 25 30
Thr Thr Ala Gly Ile Ala Tyr Thr Gly Ile Asn Asn Asp Val Tyr Thr
35 40 45
Glu Thr Lys Leu Tyr Val Ser Lys Asp Glu Lys Cys Tyr Ile Asp Gly
50 55 60
Lys Glu Ile Asp Leu Asn Ser Asp Arg Ser Pro Ser Lys Val Ile Asp
65 70 75 80
Lys Phe Lys His Glu Ile Leu Met Arg Val Asn Leu Asp Asp Glu Asn
85 90 95
Asn Leu Ser Ile Asp Ser Arg Asn Phe Asn Ile Leu Ser Gly Ser Ser
100 105 110
Asp Ser Gly Ala Ala Ala Leu Gly Glu Cys Ile Glu Ser Ile Phe Glu
115 120 125
Tyr Asn Ile Asn Ile Phe Thr Phe Glu Asn Asp Leu Gln Arg Ile Ser
130 135 140
Glu Ser Val Gly Arg Ser Leu Tyr Gly Gly Leu Thr Val Asn Tyr Ala
145 150 155 160
Asn Gly Arg Glu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Leu Glu Pro Glu Ala Phe
165 170 175
Asn Asn Phe Thr Ile Ile Gly Ala His Phe Asn Ile Asp Arg Lys Pro
180 185 190
Ser Asn Glu Ile His Glu Asn Ile Ile Lys His Glu Asn Tyr Arg Glu
195 200 205
Arg Ile Lys Ser Ala Glu Arg Lys Ala Lys Lys Leu Glu Glu Leu Ser
Página 1

```

210
215
220
Sequence listing colo 841 001 9

```

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

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

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

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

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

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

Ser Lys Asn Phe

<210>	2
<211>	318
<212>	PRT
<213>	Thermoplasma acidophilum

<400> 2

Met Thr Tyr Arg Ser Ile Gly Ser Thr Ala Tyr Pro Thr Ile Gly Val
1 5 10 15Val Leu Leu Gly Gly Ile Ala Asn Pro Val Thr Arg Thr Pro Leu His
20 25 30

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

Glu Thr Arg Ile Tyr Ala Asp Glu Ala Thr His Ile Tyr Phe Asn Gly
50 55 60

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

Tyr Ser Ser Val Phe Glu Glu Ala Phe Gly Thr Lys Thr Val Ser Tyr
85 90 95

Ser Ser Gln Asn Phe Gly Ile Leu Ser Gly Ser Ser Asp Ala Gly Ala
100 105 110

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

His Asp Val Glu Asn Asp Leu Arg Ala Val Ser Glu Ser Ala Gly Arg
130 135 140

Ser Leu Phe Gly Gly Leu Thr Ile Thr Trp Ser Asp Gly Phe His Ala

Sequence listing Colo 841 001 9

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

<210> 3
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Thermoplasma volcanium

<400> 3

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

Página 3

Sequence listing Colo 841 001 9

100

105

110

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

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

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

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

Val Gly Phe Ser Phe Asp Tyr Pro Arg Asn Pro Ser Asp Thr Ile His
180 185 190

Gln Asn Ile Ile Lys Ser Lys Arg Tyr Lys Gln Arg Thr Ile Asp Ala
195 200 205

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

Glu Gly Ile Phe Glu Lys Ala Glu Glu Asp Thr Glu Glu Tyr His Ser
225 230 235 240

Ile Leu Arg Glu Val Gly Val Leu Val Ile Arg Glu Asn Met Gln Lys
245 250 255

Leu Ile Glu Phe Ile Lys Ile Leu Arg Lys Glu Phe Trp Asn Ser Tyr
260 265 270

Ile Val Thr Gly Gly Ser Asn Val Tyr Val Ile Val Arg Arg Asp Asp
275 280 285

Leu Glu Arg Leu Ile His Ile Lys Asn Thr Phe Gly Ser Lys Pro Lys
290 295 300

Ile Leu Asn Val Ala Gly Pro Ala Trp Ile Lys Lys Val Glu Ser Asp
305 310 315 320

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

<400> 4

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

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

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

Lys Thr Asp Leu Tyr Leu Ser Asn Gln Lys Ser Gly Ile Ile Asn Gly

Sequence listing Colo 841 001 9

<400> 5

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

Sequence listing Colo 841 001 9

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

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

<210> 6
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> Streptococcus gordonii str. Challis substr. CH1
 <400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sequence listing Colo 841 001 9

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

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

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

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

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

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

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

Ala Leu Val Lys Ala Cys Asn Glu Leu Phe Glu Thr Gly Leu Thr Arg
115 120 125

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

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

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

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

Sequence listing Colo 841 001 9
 Val Glu Thr Ser Thr Thr Phe Ala Asp Trp Val Lys Gln Ser Glu Gln
 195 200 205

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

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

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

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

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

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

Val Ser Arg Thr Lys Glu Leu
 305 310

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

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sequence listing Colo 841 001 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 9

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

Sequence listing Colo 841 001 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sequence listing Colo 841 001 9

<210> 10
<211> 317
<212> PRT
<213> Streptococcus mitis (strain B6)

<400> 10
Met Asp Arg Glu Pro Val Thr Val Arg Ser Tyr Ala Asn Ile Ala Ile
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sequence listing Colo 841 001 9

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

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

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

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

<400> 11

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

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

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

Ser Phe Leu Pro Gln Ser Val Gly His Asp Glu Phe Tyr Ile Asn Gly
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sequence listing colo 841 001 9

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

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

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

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

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

Ala Ser Arg Thr Lys Val Leu Pro Asp Glu Asn Asp
305 310 315

<210> 12
<211> 315
<212> PRT
<213> Streptococcus sanguinis SK36

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

sequence listing Colo 841 001 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sequence listing Colo 841 001 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14
<211> 341
<212> PRT
<213> Streptococcus suis 89/1591

<400> 14

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

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

Ser Ser Leu Ser Leu Thr Leu Asp Ala Phe Tyr Thr Asp Thr Lys Val
35 40 45

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

Leu Gln Lys Glu Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ser Arg Phe Leu Asp Leu
65 70 75 80

Sequence listing Colo 841 001 9

Phe Cys Glu Tyr Ile Gly Glu Arg Ala Phe Ala Arg Val Glu Ser Leu
 85 90 95
 Asn Phe Val Pro Thr Ala Ala Gly Leu Ala Ser Ser Ala Ser Ala Phe
 100 105 110
 Ala Ala Leu Ala Leu Ala Thr Ala Thr Ala Leu Asp Leu Asp Leu Ser
 115 120 125
 Pro Ala Thr Leu Ser Thr Leu Ala Arg Arg Gly Ser Gly Ser Ser Thr
 130 135 140
 Arg Ser Leu Phe Gly Gly Phe Val Glu Trp Asp Met Gly Thr Gly Ser
 145 150 155 160
 Glu Asp Ser Met Ala His Pro Ile Asp Asp Ala Asp Trp Asp Ile Gly
 165 170 175
 Met Val Val Leu Ala Val Asn Thr Gly Pro Lys Lys Ile Ala Ser Arg
 180 185 190
 Glu Gly Met Asp His Thr Val Ala Thr Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Trp
 195 200 205
 Val Asp Thr Ala Lys Gln Asp Leu Ala Asp Ile Lys Ala Ala Ile Ala
 210 215 220
 Gly Arg Asp Phe Glu Lys Leu Gly Gln Ile Thr Glu His Asn Gly Met
 225 230 235 240
 Lys Met His Ala Thr Thr Leu Ser Ala Asn Pro Pro Phe Thr Tyr Trp
 245 250 255
 Ser Ala Asp Ser Leu Val Ala Gln Glu Ala Val Arg Gln Val Arg Glu
 260 265 270
 Ala Thr Gly Leu Ser Ala Tyr Met Thr Met Asp Ala Gly Pro Asn Val
 275 280 285
 Lys Val Leu Cys Arg Ala Ser Gln Met Asp Glu Leu Val Ala Glu Leu
 290 295 300
 Ala Lys Val Phe Pro Arg Glu Lys Ile Ile Thr Ser Lys Pro Gly Pro
 305 310 315 320
 Ala Ala Tyr Val Leu Ser Glu Asp Glu Trp Gln Thr Ser Gln Ala Ala
 325 330 335
 Phe Glu Lys Gly Leu
 340

<210> 15
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> Streptococcus salivarius SK126
 <400> 15

Sequence listing Colo 841 001 9

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

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

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

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

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

Leu Phe Arg Asn Asn Ser Asn Gln His Val Lys Ile Glu Thr Trp Asn
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

85

Sequence listing Colo 841 001 9

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

87

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference S1768 PCT S3	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEA/416	
International application No. PCT/EP2011/068174	International filing date (<i>day/month/year</i>) 18.10.2011	Priority date (<i>day/month/year</i>) 19.10.2010
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C12N9/88		
Applicant Global Bioenergies		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ (<i>sent to the applicant and to the International Bureau</i>) a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2). ☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)). b. ☐ (<i>sent to the International Bureau only</i>) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 23.04.2012	Date of completion of this report 21.03.2013	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office Gitschiner Str. 103 D-10958 Berlin Tel. +49 30 25901 - 0 Fax: +49 30 25901 - 840	Authorized officer Schröder, Gunnar Telephone No. +49 30 25901-326	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2011/068174

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-34 as originally filed

Sequence listings, SEQ ID NO

1-15 as originally filed

Claims, Numbers

1-19 as originally filed

Drawings, Sheets

1/13-13/13 as originally filed

- ☒ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/EP2011/068174

5. ☐ This report has been established:
- ☐ taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
 - ☐ without taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91(Rules 66.4bis and 70.2(e)).
6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-17</u>
	No: Claims	<u>18, 19</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-17</u>
	No: Claims	<u>18, 19</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-19</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2011/068174

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
 - ☐ to this Authority as an amendment on
 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
 3. Additional comments:
- * *If item 4 in Box No. I applies, the sequence listing, which forms part of the basis of the report, may be marked "superseded."*

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial
applicability; citations and explanations supporting such statement**

Reference is made to the following document:

D1 WO 2010/001078 A2 (MARLIERE PHILIPPE [FR]) 7 January 2010
(2010-01-07) cited in the application

- 1 The arguments in the Applicants reply letters of 23.04.2012 and 05.03.2013 have been taken into account.
- 2 Novelty and inventive step
 - 2.1 Claims 1-17
 - 2.1.1 The subject-matter of claims 1-17 is novel and involves an inventive step in the sense of Art. 33(2) and 33(3) PCT.
 - 2.1.2 The document D1, which is considered to represent the closest prior art to the subject matter of the present application, discloses:

A method for producing an alkene, characterized in that it comprises the conversion of a 3-hydroxyalkanoate into said alkene by an enzyme having an activity of first converting the 3-hydroxyalkanoate into the corresponding 3-phosphonoxyalkanoate; and then converting said 3-phosphonoxyalkanoate into said alkene, microorganisms producing such enzymes, a composition comprising the said microorganism in a suitable culture medium, and the uses of the enzyme in enzymatically producing alkenes from 3-hydroxyalkanoates.
 - 2.1.3 The difference between D1 and the present application is that a combination of two different enzymes, with different activities for the individual steps of the method, are used.
 - 2.1.4 The technical effect of this difference is a higher efficiency/ higher yields (see page 8 of the description and the examples), and the problem to be solved is therefore to improve the process.
 - 2.1.5 The solution is considered to involve an inventive step. The prior art does not teach that using two separate MDP decarboxylases for the two steps (i and ii), which two steps are normally carried out by a single enzyme, could increase product yields and efficiency.
 - 2.2 Claims 18 and 19

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2011/068174

- 2.2.1 Claims 18 and 19 lack novelty in the sense of Art. 33(2) PCT with regard to the document D1.
- 2.2.2 The method of the document D1 inherently comprises the step of the conversion of the intermediate 3-phosphonoxyalkanoate into the corresponding alkene by a mevalonate diphosphate (MDP) decarboxylase see Figure 2B and page 9, lines 3-5).
- 2.2.3 Nothing in claim 18 says that the substrate 3-phosphonoxyalkanoate should be added externally to the enzyme, or that the substrate may not be generated in situ. The claim has to be interpreted in its broadest sense. Therefore, the claim also encompasses reactions wherein the 3-phosphonoxyalkanoate is not added as an isolated compound, such as the method of the document D1.
- 2.2.4 The problem with claim 18 may alternatively be formulated as a clarity problem. If the Applicant indeed intended to refer only to a method comprising converting a previously isolated 3-phosphonoxyalkanoate compound, then this should have been clearly stated in the claim.

3 Further points

Concerning the previous objection to lack of support of the claims and lack of sufficiency of disclosure (item VIII, point 1.-1.2.1), the arguments and the supplementary experimental data provided in the Applicant's reply letters of 23.04.2012 and 05.03.2013 are deemed persuasive. The objections are therefore dropped, and the Examining Division is of the opinion that claims 1-17 fulfill the requirements of Art. 6 PCT and that the application fulfills the requirements of Art. 5 PCT.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

VOSSIUS & PARTNER (No. 31)
Siebertstraße 4
81675 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 07 August 2012 (07.08.2012)
Applicant's or agent's file reference S1768 PCT S3
International application No. PCT/EP2011/068174

IMPORTANT NOTIFICATION
International filing date (day/month/year) 18 October 2011 (18.10.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☐ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☒ the person		
☐ the name		
☐ the address		
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	LU	LU
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
E-mail address	☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary: The person identified in Box 2 has been added as applicant for all designated States except US.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☒ the International Preliminary Examining Authority	
☐ the International Searching Authority	☐ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☒ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Mondon Catherine
Facsimile No. +41 22 338 89 70	e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

VOSSIUS & PARTNEr (No. 31)
Siebertstraße 4
81675 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year)
07 August 2012 (07.08.2012)

Applicant's or agent's file reference
S1768 PCT S3

International application No.
PCT/EP2011/068174

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
18 October 2011 (18.10.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:
☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
MARLIÈRE, Philippe
173, rue de Rolleghem
B-7700 Mouscron
Belgium

State of Nationality
FR

State of Residence
BE

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:
☐ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
MARLIÈRE, Philippe
173, rue de Rolleghem
B-7700 Mouscron
Belgium

State of Nationality
FR

State of Residence
BE

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 has been recorded as applicant for US only and inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search

☒ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☒ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Mondon Catherine
e-mail pt06.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 06

Facsimile No. +41 22 338 89 70

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

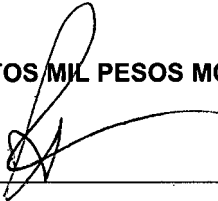
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0035816
		Bogotá D.C., Abril 16 de 2013 - 16:50:20

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	196871846	16/04/2013	29.281.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00 500.000.00
			<u>\$500.000.00</u>
			=====

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-100240- -00000-0000
Fecha: 2013-04-18 16:49:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 97

COLO: 20136-841-001-9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0032903

Bogotá D.C., Abril 09 de 2013 - 16:12:08

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	196871872	09/04/2013	11.680.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1850 SOL. TRANSFERENCIA / LICENCIA USO MULTI-MARCA / LEMA	270.000.00	270.000.00
				\$270.000.00

SON: **DOSCIENTOS SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-100240- -00000-0000

Fecha: 2013-04-18 16:49:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 97

COLO: 20136-844001-9

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Abril 9 de 2013 - 16:12:13

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD FASE NACIONAL PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 10188001.1 2010/10/19 EP		(51) Int Cl: C12N 009/088 (71) Solicitante(s) GLOBAL BIOENERGIES y SCIENTIST OF FORTUNE S.A. (72) Inventor(es) PHILIPPE MARLIÈRE Y OTROS (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 2013/05/19 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 2011/10/18 No. de solicitud PCT/EP2011/068174		(87) Publicación internacional Fecha: 2012/04/26 N° publicación: WO 2012/052427 A1	
(54) Título: PRODUCCIÓN DE ALQUENOS MEDIANTE CONVERSIÓN ENZIMÁTICA COMBINADA DE ÁCIDOS 3-HIDROXIALCANOICOS			

Resumen:

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

PATENTE DE INVENCION ☐

M.



No. 13-100240-00000-0000

Fecha: 2013-04-18 16:49:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 97

486/00

☐

Indicación que se solicita una

☐

Datos de identificación del so

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐

Indicación que se solicita una PCT

☐

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia:		Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador			Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13-100240	--0	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:
NO SE PUEDE SUBIR INFORMACION ELECTRONICA DE CD ANEXO A ESTA PATENTE, YA QUE CONTIENE ARCHIVOS EN FORMATO TEXTO POR LO QUE EL SISTEMA SOLO PERMITE INDEXAR ARCHIVO EN FORMATO PDF

Yenny ARTUNOQUAGA
19-04-13