



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 847**

51 Int. Cl.:  
**C12P 7/24** (2006.01)  
**C12N 9/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06841443 .2**  
96 Fecha de presentación : **19.12.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1974045**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2008**

54 Título: **Método para la preparación enzimática de citronelal.**

30 Prioridad: **30.12.2005 DE 10 2005 063 191**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.11.2011**

73 Titular/es: **BASF SE**  
**67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es: **Schädler, Andreas;**  
**Friedrich, Thomas;**  
**Stürmer, Rainer y**  
**Rinck-Jahnke, Sabine**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 367 847 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para la preparación enzimática de citronelal

La invención se refiere a un método enzimático para la producción de aldehídos o alcoholes saturados ópticamente activos de la fórmula a partir de aldehídos  $\alpha$   $\beta$  -insaturados, en particular un método para la producción de citronelal.

## 5 Estado de la técnica

El (R)-(+)-citronelal es un importante producto químico intermedio, el cual es empleado por ejemplo en la producción de mentol.

Los métodos químicos para la producción de (R)-(+)-citronelal proveniente de citral requieren procedimientos muy costosos (exclusión de oxígeno y agua), lo cual conduce a elevados costos en una síntesis técnica.

## 10 Definición del objetivo

Fue el objetivo de poner a disposición un método para la producción de citronelal mediante reducción enantioselectiva de citral, el cual suministrara enantiómeros de citronelal tan puros como fuera posible en un elevado rendimiento químico.

Descripción de la invención

15 La presente invención se refiere a un método para la producción de aldehídos o alcoholes saturados ópticamente activos de la fórmula (2) a partir de aldehídos  $\alpha$   $\beta$  -insaturados de la fórmula (1) mediante reducción en presencia de una enoato-reductasa

(i) con la secuencia de polipéptidos SEQ ID NO:1 o 2, o

## 20 (ii) con una secuencia de polipéptidos la cual exhibe por lo menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1 o 2.



donde  $R^1$  y  $R^2$  significan independientemente uno de otro H, alquilo  $C_1$ - $C_4$ ,  $R^3$  significa H, alquilo o alqueno  $C_1$ - $C_6$  en forma ramificada y no ramificada.

25 El método acorde con la invención puede ser ejecutado con aldehídos  $\alpha,\beta$  insaturados de la fórmula (1), en los cuales  $R^1$  y  $R^2$  significan independientemente uno de otro H, alquilo  $C_1$ - $C_4$  en forma ramificada y no ramificada,  $R^3$  significa H, alquilo o alqueno  $C_1$ - $C_6$  en forma ramificada y no ramificada. Los radicales alquilo o alqueno pueden estar sustituidos también una o varias veces.30 Son sustratos particularmente adecuados para el método acorde con la invención los aldehídos  $\alpha,\beta$  -insaturados de la fórmula (1), en los cuales  $R^1$  significa H,  $R^2$  significa  $CH_3$  y  $R^3$  significa  $-CH_2-CH_2-CH=(CH_3)_2$  (citral en forma cis o trans) y aquellos en los cuales  $R^1$  significa  $CH_3$ ,  $R^2$  significa H y  $R^3$  significa  $CH_3$  (2- metil -pent-2-en-1-al).

Las enoato-reductasas acordes con la invención empleadas reducen ocasionalmente en forma parcial, aparte del doble enlace en posición  $\alpha,\beta$  a la función carbonilo, también a la función carbonilo en sí misma, mediante lo que se forma entonces el correspondiente alcohol.

## 35 Para el método acorde con la invención son enoato-reductasas adecuadas aquellas enzimas que están en capacidad de reducir 2-metil-pent-2-en-1-al en una reacción dependiente de NADPH hasta (S)-2-metil-pentan-1-al. En lo que sigue, se denomina esta reacción también reacción modelo.

Además las enoato-reductasas adecuadas para el método acorde con la invención poseen una secuencia de polipéptidos según SEQ ID NO:1 o NO:2 o una secuencia de polipéptidos que exhibe por lo menos 80%,

preferiblemente por lo menos 90%, particularmente preferido por lo menos 95% y en particular por lo menos 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1 o 2.

Un polipéptido con la SEQ ID NO:1 es el gen OYE2 de levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae* Genlocus YHR179W).

- 5 Un polipéptido con la SEQ ID NO:2 es el gen OYE3 de levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae* Genlocus YPL171C).

La investigación de la identidad de secuencia para el propósito aquí descrito, debería ocurrir mediante el programa de computador "GAP" del Grupo de Genética por Computador (GCG) de la Universidad de Wisconsin, donde debería usarse la versión 10.3 empleando los parámetros estándar recomendados por GCG.

- 10 Tales enoato-reductasas pueden ser obtenidas provenientes de SEQ ID NO:1 o 2 mediante métodos conocidos por los expertos de mutagénesis dirigida o aleatoria. Sin embargo, de modo alternativo pueden buscarse también enoato-reductasas en microorganismos, preferiblemente en aquellos de los géneros *Alishewanella*, *Alterococcus*, *Aquamonas*, *Aranicola*, *Arsenophonus*, *Azotivirga*, *Brenneria*, *Buchnera* (*aphid P-endosymbionts*), *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Candidatus Phlomobacter*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Grimontella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Photorhabdus*, *Plesiomonas*, *Pragia*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Salmonella*, *Samsonia*, *Serratia*, *Shigella*, *Sodalis*, *Tatumella*, *Trabulsiella*, *Wigglesworthia*, *Xenorhabdus*, *Yersinia* o *Yokenella*, reductasas que catalizan la reacción modelo arriba mencionada y cuya secuencia de aminoácidos ya exhibe la identidad de secuencia necesaria hacia SEQ ID NO:1 o 2 o es obtenida mediante métodos de mutagénesis.

La enoato-reductasa puede ser empleada en forma purificada o parcialmente purificada o también en forma del microorganismo en sí mismo. Los métodos para la obtención y purificación de las deshidrogenasas a partir de microorganismo son ampliamente conocidos por los expertos.

- 25 La reducción enantioselectiva ocurre preferiblemente con la enoato-reductasa en presencia de un cofactor adecuado (también definido como cosustrato). Como cofactores para la reducción de la cetona sirven comúnmente NADH y/o NADPH. Aparte de ello pueden emplearse también enoato-reductasas como sistemas celulares, los cuales contienen de modo inherente cofactor, o de modo alternativo se añaden mediadores redox (A. Schmidt, F. Hollmann y B. Bühler "Oxidation of Alcohols" en K. Drauz y H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* 2002, Vol.III, 991-1032, Wiley-VCH, Weinheim).

- 30 La reducción enantioselectiva ocurre preferiblemente con la enoato-reductasa además en presencia de un agente reductor adecuado, el cual regenera al cofactor oxidado en el curso de la reducción. Son ejemplos de agentes reductores adecuados los azúcares, en particular hexosas, como glucosa, manosa, fructosa, y/o alcoholes que pueden oxidarse, en particular etanol, propanol o isopropanol, así como formiato, fosfito o hidrógeno molecular. Para la oxidación del agente reductor y unido a ello para la regeneración de la coenzima puede añadirse una segunda deshidrogenasa, como por ejemplo glucosa-deshidrogenasa en el empleo de glucosa como agente reductor, o formiato-deshidrogenasa en el empleo de formiato como agente reductor. Éste puede emplearse como enzima libre o inmovilizada o en forma de células libres o inmovilizadas. Su producción puede ocurrir tanto separadamente como también mediante coexpresión en una cepa-reductasa (recombinante).

- 40 Una forma preferida de operar del método reivindicado es la regeneración de los cofactores mediante un sistema enzimático, en el cual se emplea una segunda deshidrogenasa, particularmente preferido una glucosa-deshidrogenasa.

Otro objetivo de la invención es el empleo de la enoato-reductasa para la producción de citronelal.

- 45 En esta forma de operar se emplean preferiblemente como cofactores  $\text{NAD}^+$  o bien  $\text{NADP}^+$ , los cuales pueden ser regenerados nuevamente con el correspondiente cosustrato (agente oxidante). Como cosustrato puede emplearse aquí preferiblemente acetona la cual regenera el cofactor con el ADH ya presente y/o una deshidrogenasa empleada adicionalmente, donde es reducida hasta isopropanol.

En el marco de la presente invención "enantioselectividad" significa que el exceso de enantiómero ee (en %) del enantiómero S, el cual se calcula de forma conocida según:

$$ee (\%) = \frac{\text{enantiómero S} - \text{enantiómero R}}{(\text{enantiómero S} + \text{enantiómero R})} \times 100$$

es por lo menos 80 %, preferiblemente por lo menos 90 %, en particular por lo menos 95 % y especialmente por lo menos 97 %.

5 Las enoato-reductasas empleadas de acuerdo con la invención pueden emplearse libres o inmovilizadas. Se entiende por enzima inmovilizada una enzima que esta fija sobre un soporte inerte. A partir de las EP-A-1149849, EP-A-1 069 183 y la DE-OS 100193773 así como de las citas de literatura allí consignadas se conocen materiales de soporte adecuados así como enzimas allí inmovilizadas. A los materiales de soporte adecuados pertenecen por ejemplo arcillas, minerales arcillosos, como caolinita, tierras diatomáceas, perlita, dióxido de silicio, óxido de aluminio, carbonato de sodio, carbonato de calcio, celulosa en polvo, materiales de intercambio aniónico, polímeros sintéticos como poliestireno, resina acrílica, resina de fenol formaldehído, poliuretanos y poliolefinas como polietileno y polipropileno. Los materiales de soporte son empleados para la producción de enzimas soportadas, comúnmente en forma de partículas muy finas, donde se prefieren las formas porosas. Comúnmente, el tamaño de partícula del material de soporte comúnmente es no mayor a 5 mm, en particular no mayor a 2 mm (curva granulométrica). De modo análogo en el empleo de la deshidrogenasa como catalizador de célula completa puede elegirse una forma libre o inmovilizada. Los materiales de soporte son por ejemplo alginato de calcio y carragenina. 10 Las enzimas como también las células pueden entrelazarse también directamente con glutaraldehído (entrelazamiento hasta CLEAs). Métodos de inmovilización correspondiente y adicionales se describen por ejemplo en J. Lalonde y A. Margolin "Immobilization of Enzymes" in K. Drauz y H. Waldmann, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis 2002, Vol.III, 991-1032, Wiley-VCH, Weinheim. 15

20 La reacción puede ocurrir en medios de reacción acuosos o no acuosos o en sistemas de dos fases o (micro-) emulsiones. Los medios acuosos de reacción son preferiblemente soluciones tamponadas, que exhiben por regla general un pH de 4 a 8, preferiblemente de 5 a 8. Los solventes acuosos pueden contener, aparte de agua, por lo menos un alcohol, por ejemplo etanol o isopropanol o dimetilsulfóxido.

25 Se entiende por medios de reacción no acuosos los medios de reacción que contienen menos de 1 % en peso, preferiblemente menos de 0,5 % en peso de agua, referido al peso total del medio de reacción. Preferiblemente, la reacción es ejecutada en un solvente orgánico.

30 Son por ejemplo solventes adecuados los hidrocarburos alifáticos, preferiblemente con 5 a 8 átomos de carbono, como pentano, ciclopentano, hexano, ciclohexano, heptano, octano o ciclooctano, hidrocarburos alifáticos halogenados, preferiblemente con uno o dos átomos de carbono, como diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, dicloroetano o tetracloroetano, hidrocarburos aromáticos como benceno, tolueno, los xilenos, clorobenceno o diclorobenceno, éteres o alcoholes alifáticos acíclicos y cíclicos, preferiblemente con 4 a 8 átomos de carbono, como dietiléter, metil-tert-butiléter, etil-tert-butiléter, dipropiléter, diisopropiléter, dibutiléter, tetrahidrofurano o ésteres como acetato de etilo o acetato de n-butilo o cetonas como metilisobutilcetona o dioxano o mezclas de ellos. De modo particularmente preferido se emplean los éteres antes mencionados, en particular tetrahidrofurano.

35 Preferiblemente se lleva a cabo la reducción con la enoato-reductasa en un medio de reacción acuoso-orgánico, en particular acuoso.

En la reducción enzimática, el sustrato (1) es empleado preferiblemente en una concentración de 0,1 g/l a 500 g/l, particularmente preferido de 1 g/l a 50 g/l y puede ser alimentado de modo continuo o discontinuo.

40 Por regla general la reducción enzimática ocurre a una temperatura de reacción por debajo de la temperatura de desactivación de la reductasa empleada y por encima de -10 °C. De modo particularmente preferido ella está en el rango de 0 a 100 °C, en particular de 15 a 60 °C y especialmente de 20 a 40 °C, como por ejemplo a aproximadamente 30°C.

45 Para la ejecución puede por ejemplo colocarse el sustrato (1) con la enoato-reductasa, el solvente y dado el caso la coenzima, dado el caso una segunda deshidrogenasa para la regeneración de la coenzima y/u otros agentes reductores y mezclar la mezcla, por ejemplo mediante agitación o sacudiendo. Es posible también inmovilizar la reductasa en un reactor, por ejemplo en una columna y conducir a través del reactor una mezcla que contiene el sustrato y dado el caso coenzima y/o cosustrato. Para esto puede conducirse la mezcla en el circuito a través del reactor hasta que se alcanza el rendimiento deseado.

50 En ello se reduce hasta enlace sencillo el doble enlace en la posición  $\alpha,\beta$  a la función carbonilo; ocasionalmente ocurre también una reducción de la función carbonilo en sí misma hasta la función alcohol. Por regla general se conduce la reducción hasta un rendimiento de por lo menos 70 %, particularmente preferido de por lo menos 85 % y en particular de por lo menos 95%, referido al sustrato presente en la mezcla. En ello, pueden hacerse seguimiento al avance de la reacción, es decir la reducción secuencial del doble enlace, mediante métodos comunes como cromatografía de gases o cromatografía líquida de alta presión.

En el marco de la presente invención, "equivalentes funcionales" o análogos de la enzima manifestados de modo concreto son polipéptidos diferentes de ella, los cuales poseen además la actividad biológica deseada, como por ejemplo especificidad al sustrato. De este modo se entienden por ejemplo por "equivalentes funcionales" enzimas que catalizan la reacción modelo y exhiben por lo menos 20 %, preferiblemente 50 %, particularmente preferido 75 %  
 5 %, muy particularmente preferido 90 % de la actividad de una enzima, incluyendo una de las secuencias de aminoácidos mencionadas bajo SEQ ID NO:1 o 2. Además los funcionales equivalentes son estables preferiblemente entre pH 4 a 10 y poseen de modo ventajoso pH óptimo entre pH 5 y 8 así como una temperatura óptima en el rango de 20°C a 80°C.

De acuerdo con la invención se entiende por "equivalentes funcionales" en particular también mutantes, los cuales en por lo menos una posición de secuencia de las secuencias de aminoácidos arriba mencionadas exhiben otra diferente a la del de aminoácido mencionado concretamente pero que a pesar de ello poseen una de las actividades biológicas arriba mencionadas. "Equivalentes funcionales" incluyen con ello los mutantes obtenibles mediante una o varias readiciones, sustituciones, borrados y/o inversiones de aminoácidos, donde pueden tener lugar los cambios mencionados en las respectivas posiciones, en tanto ellos conduzcan a un mutante con perfil de propiedades acorde con la invención. En particular se da la equivalencia funcional también cuando el patrón de reactividad entre el mutante y el polipéptido no cambiado coincide cualitativamente, es decir por ejemplo sustratos iguales reaccionan con diferente velocidad.

De la siguiente tabla pueden tomarse ejemplos de sustituciones adecuadas de aminoácidos:

	Radical original	Ejemplos de la sustitución
20	Ala	Ser
	Arg	Lys
	Asn	Gln; His
	Asp	Glu
	Cys	Ser
25	Gln	Asn
	Glu	Asp
	Gly	Pro
	His	Asn ; Gln
	Ile	Leu; Val
30	Leu	Ile; Val
	Lys	Arg ; Gin ; Glu
	Met	Leu ; Ile
	Phe	Met ; Leu ; Tyr
	Ser	Thr
35	Thr	Ser
	Trp	Tyr
	Tyr	Trp ; Phe
	Val	Ile; Leu

En el sentido dado arriba, "equivalentes funcionales" son también "precursores" de los polipéptidos descritos así como "derivados funcionales".

En ello son "precursores" los precursores naturales o sintéticos de los polipéptidos con o sin la actividad biológica deseada.

- 5 Así mismo, pueden producirse "derivados funcionales" de polipéptidos acordes con la invención en grupos funcionales aminoácido laterales o en sus extremos N- o C-terminales, con ayuda de técnicas conocidas. Tales derivados incluyen por ejemplo ésteres alifáticos de grupos ácido carboxílico, amidas de grupos ácido carboxílico, obtenibles mediante reacción con amoníaco o con una amina primaria o secundaria; N-acilderivados de grupos amino libres producidos mediante reacción con grupos acilo; u O-acilderivados de grupos hidroxilo libre, producidos  
10 mediante reacción con grupos acilo.

En el caso de una posible glicosilación de proteína, "equivalentes funcionales" acordes con la invención incluyen proteínas del tipo definido arriba en forma desglucosilada o glicosilada así como formas obtenibles modificadas mediante el cambio del patrón de glicosilación.

- 15 Naturalmente "equivalentes funcionales" incluyen también polipéptidos que son accesibles a partir de otros organismos, así como variantes que se encuentran de modo natural. Por ejemplo, mediante comparación de secuencias, se fijan rangos de regiones de secuencia homóloga y con base en los requisitos concretos de la invención, se determina la enzima equivalente.

Así mismo "equivalentes funcionales" incluyen fragmentos, preferiblemente dominios individuales o motivos de secuencia de los polipéptidos acordes con la invención, los cuales por ejemplo exhiben la función biológica deseada.

- 20 Son además "equivalentes funcionales" las proteínas de fusión, los cuales exhiben una de las secuencias de polipéptidos arriba mencionadas o equivalentes funcionales derivados de ellas y por lo menos otra secuencia heteróloga funcionalmente diferente de ella en unión funcional N- o C-terminal (es decir sin deterioro recíproco funcional esencial de la fracción de fusión de proteína). Son ejemplos no limitantes de tales secuencias heterólogas por ejemplo péptidos de señal o enzimas.

- 25 Pueden identificarse homólogos de la proteína acorde con la invención mediante discriminación de bancos combinatorios de mutantes, como por ejemplo mutantes de acortamiento. Por ejemplo puede generarse un variado banco de variantes de proteína mediante mutagénesis combinatoria en planos de ácido nucleico, como por ejemplo mediante ligado enzimático de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos. Existe por ejemplo una multiplicidad de métodos que pueden ser empleados para la producción de bancos de homólogos potenciales de una secuencia  
30 degenerada de oligonucleótidos. La síntesis química de una secuencia contraria degenerada puede ser ejecutada en un equipo de síntesis de ADN y el gen sintético puede entonces ser ligado en un vector adecuado de expresión. El empleo de una frase degenerada de gen hace posible el suministro de secuencias completas en una mezcla que codifica la frase deseada en secuencias potenciales de proteína. Los expertos conocen métodos para la síntesis de oligonucleótidos degenerados (por ejemplo Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al., (1984) *Science* 198:1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11:477).  
35

- En el estado de la técnica se conocen varios métodos para el discriminación de productos de gen de bancos combinatorios, que habían sido producidos mediante mutaciones puntuales o acortamiento, y para el discriminación de bancos cADN en productos de gen con una propiedad elegida. Estas técnicas se adaptan a la discriminación rápida de bancos de gen, los cuales habían sido generados mediante mutagénesis combinatoria de homólogos  
40 acordes con la invención. Las técnicas más frecuentemente empleadas para el discriminación de grandes bancos de gen, las cuales están sujetas a un análisis con elevada eficiencia, incluyen la clonación del banco de gen en vectores de expresión que pueden ser replicados, la transformación de células adecuadas con el bancos resultantes de vectores y la expresión de los genes combinatorios, bajo condiciones bajo las cuales la demostración de la actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto fue demostrado. La *Recursive-Ensemble-Mutagenese* (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales, puede ser  
45 empleada en combinación con las técnicas de discriminación, para identificar homólogos (Arkin y Yourvan (1992) *PNAS* 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331).

- Son además objetivos de la invención secuencias de ácido nucleico (secuencias de ADN y ARN de cuerda sencilla y cuerda doble, como por ejemplo cADN y mARN) que codifican para una enzima con la actividad de reductasa acorde  
50 con la invención. Se prefieren secuencias de ácido nucleico los cuales codifican por ejemplo para secuencias de aminoácidos según SEQ ID NO:1 o 2 o secuencias parciales características de ellos.

Todas las secuencias de ácidos nucleicos aquí mencionadas pueden ser producidas de manera de por si conocida, mediante síntesis química a partir de las unidades estructurales de nucleótidos, como por ejemplo mediante condensación de fragmentos de elementos constituyentes de ácido nucleico de la doble hélice, que se traslapan de

modo individual y son complementarios. La síntesis química de oligonucleótidos puede ocurrir por ejemplo de manera conocida según el método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2ª edición, Wiley Press New York, páginas 896-897). La adición de oligonucleótidos sintéticos y el rellenado de brechas con ayuda de fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa y reacciones de ligado así como métodos generales de clonación son descritos en Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Otras modificaciones para la ejecución del método de reducción enzimática acorde con la invención

Las enoato-reductasas pueden ser empleadas en el método acorde con la invención como enzima libre o inmovilizada.

El método acorde con la invención es ejecutado de modo ventajoso a una temperatura entre 0 °C a 95 °C, preferiblemente entre 10 °C a 85 °C, particularmente preferido entre 15 °C a 75 °C.

El valor de pH en el método acorde con la invención es mantenido ventajosamente entre pH 4 y 12, preferiblemente entre pH 4,5 y 9, particularmente preferido entre pH 5 y 8. En el método acorde con la invención se entiende por productos de enantiómeros puros o bien productos quirales (2) los enantiómeros que muestran un enriquecimiento enantiomérico. Preferiblemente en el método se alcanzan purezas de enantiómero de por lo menos 70 %ee, preferiblemente de por lo menos 80 %ee, particularmente preferido de por lo menos 90 %ee, muy particularmente preferido de por lo menos 98 %ee.

Para el método acorde con la invención pueden emplearse células en crecimiento que contienen los ácidos nucleicos, estructuras de ácidos nucleicos o vectores acordes con la invención. También pueden emplearse células en reposo o células desintegradas. Se entiende por células desintegradas por ejemplo células que mediante un tratamiento con, por ejemplo, solventes habrían sido convertidas en porosas, o células que por un tratamiento enzimático, por un tratamiento mecánico (por ejemplo celda de presión o ultrasonido) o por otro método fue abierta. Los extractos crudos así obtenidos son adecuados de modo ventajoso para el método acorde con la invención. Para el método también pueden emplearse enzimas purificadas o no. Así mismo son adecuados microorganismos o enzimas inmovilizados, los cuales pueden encontrar aplicación de modo ventajoso en la reacción.

El método acorde con la invención puede ser operado por lotes, en forma semicontinua o continua.

La ejecución del método puede ocurrir de modo ventajoso en bioreactores, como se describe por ejemplo en *Biotechnology*, volumen 3, 2ª edición, Rehm et al Hrsg., (1993) en particular capítulo II.

Los siguientes ejemplos deberían ilustrar la invención, sin que ellos sin embargo la limiten. Con esto se hace referencia a cualquier ilustración, que muestra:

### 30 Parte experimental

#### Biotransformación de 2-metil-pent-2-en-1-al con *Saccharomyces cerevisiae*

Las biotransformaciones fueron ejecutadas en matraces Erlenmeyer de 500 ml con deflectores internos. Estaban presentes 126 ml de solución de transformación. A las cargas se añadieron 21 g de D-glucosa. Se ajustó el valor deseado de pH (entre 6 y 8,5). La cantidad de sustrato era de 200 mg de 2-metil-pent-2-en-1-al por matraz. En el punto inicial de tiempo se añadieron 21 g de levadura de panadería y se ajustaron las cargas a la temperatura deseada (entre 28 y 37°C) en el armario de incubación (agitado con 240 rpm). Se tomaron muestras después de 6, 12, 18, 24, 36, 48 horas y se las analizó por cromatografía de gases.

Se alcanzó la tasa más alta de rendimiento a valores de pH entre 7,5 y 8,5 (40-70%). A un valor de pH= 8,5 y T=37°C se tuvo una pureza óptica de ee=92,1 con un rendimiento de 66,6%.

#### 40 Biotransformación de citral con *Saccharomyces cerevisiae*

Se llevaron a cabo las biotransformaciones en matraces Erlenmeyer de 500 ml con deflectores internos. Estaban presentes 126 ml de solución de transformación. A las cargas se añadieron 21 g de D-glucosa. Se ajustó el valor deseado de pH (entre 6 y 8,5). La cantidad de sustrato era de 210 mg de citral por matraz. (El citral era una mezcla cis/trans de 70:30). En el punto inicial de tiempo se le añadieron 21 g de levadura de panadería y se ajustaron las cargas a la temperatura deseada (entre 28 y 37°C) en el armario de incubación (agitando con 240 rpm). Se tomaron muestras después de 6, 12, 18, 24, 36, 48 horas y se las analizó por cromatografía de gases.

Aparte de (R)-(+)-citronelal se obtuvieron también aún (R)-(+)-β-citronelol así como nerol y geraniol.

Solución de transformación

53,4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 21 g de D-glucosa y 126 ml de agua destilada (pH ajustado entre 6 y 8,5).

LISTADO DE SECUENCIA

<110> BASF AG.

5 <120> Método para la producción enzimática de citronelal

<130> AE20040629

<160> 2

<170> Patentin versión 3. 1

<210> 1

10 <211> 400

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1



Met Pro Phe Val Lys Asp Phe Lys Pro Gln Ala Leu Gly Asp Thr Asn  
 1 5 10 15  
 Leu Phe Lys Pro Ile Lys Ile Gly Asn Asn Glu Leu Leu His Arg Ala  
 20 25 30  
 Val Ile Pro Pro Leu Thr Arg Met Arg Ala Gln His Pro Gly Asn Ile  
 35 40 45  
 Pro Asn Arg Asp Trp Ala Val Glu Tyr Tyr Ala Gln Arg Ala Gln Arg  
 50 55 60  
 Pro Gly Thr Leu Ile Ile Thr Glu Gly Thr Phe Pro Ser Pro Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Gly Gly Tyr Asp Asn Ala Pro Gly Ile Trp Ser Glu Glu Gln Ile Lys  
 85 90 95  
 Gu Trp Thr Lys Ile Phe Lys Ala Ile His Glu Asn Lys Ser Phe Ala  
 100 105 110  
 Trp Val Gln Leu Trp Val Leu Gly Trp Ala Ala Phe Pro Asp Thr Leu  
 115 120 125  
 Ala Arg Asp Gly Leu Arg Tyr Asp Ser Ala Ser Asp Asn Val Tyr Met  
 130 135 140  
 Asn Ala Glu Gln Glu Glu Lys Ala Lys Lys Ala Asn Asn Pro Gln His  
 145 150 155 160  
 Ser Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Gln Tyr Val Lys Glu Tyr Val Gln  
 165 170 175  
 Ala Ala Lys Asn Ser Ile Ala Ala Gly Ala Asp Gly Val Glu Ile His  
 180 185 190

Ser Ala Asn Gly Tyr Leu Leu Asn Gln Phe Leu Asp Pro His Ser Asn  
195 200 205

Asn Arg Thr Asp Gu Tyr Gy Gy Ser Ile Gu Asn Arg Ala Arg Phe  
210 215 220

Thr Leu Gu Val Val Asp Ala Val Val Asp Ala Ile Gy Pro Gu Lys  
225 230 235 240

Val Gy Leu Arg Leu Ser Pro Tyr Gy Val Phe Asn Ser Met Ser Gy  
245 250 255

Gy Ala Gu Thr Gy Ile Val Ala Gln Tyr Ala Tyr Val Leu Gy Gu  
260 265 270

Leu Gu Arg Arg Ala Lys Ala Gy Lys Arg Leu Ala Phe Val His Leu  
275 280 285

Val Gu Pro Arg Val Thr Asn Pro Phe Leu Thr Gu Gy Gu Gy Gu  
290 295 300

Tyr Asn Gy Gy Ser Asn Lys Phe Ala Tyr Ser Ile Trp Lys Gy Pro  
305 310 315 320

Ile Ile Arg Ala Gy Asn Phe Ala Leu His Pro Gu Val Val Arg Gu  
325 330 335

Gu Val Lys Asp Pro Arg Thr Leu Ile Gy Tyr Gy Arg Phe Phe Ile  
340 345 350

Ser Asn Pro Asp Leu Val Asp Arg Leu Gu Lys Gy Leu Pro Leu Asn  
355 360 365

Lys Tyr Asp Arg Asp Thr Phe Tyr Lys Met Ser Ala Gu Gy Tyr Ile  
370 375 380

Asp Tyr Pro Thr Tyr Gu Gu Ala Leu Lys Leu Gy Trp Asp Lys Asn  
385 390 395 400

<210> 2<211> 400<212> PRT<213> Saccharomyces cerevisiae<400> 2

Met Pro Phe Val Lys Gy Phe Gu Pro Ile Ser Leu Arg Asp Thr Asn  
1 5 10 15

Leu Phe Gu Pro Ile Lys Ile Gy Asn Thr Gln Leu Ala His Arg Ala  
20 25 30

Val Met Pro Pro Leu Thr Arg Met Arg Ala Thr His Pro Gy Asn Ile  
35 40 45

Pro Asn Lys Gu Trp Ala Ala Val Tyr Tyr Gy Gln Arg Ala Gln Arg

ES 2 367 847 T3

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

Gln Val Lys Asp Pro Arg Thr Leu Ile Gly Tyr Gly Arg Phe Phe Ile  
 340 345 350

Ser Asn Pro Asp Leu Val Tyr Arg Leu Glu Glu Gly Leu Pro Leu Asn  
 355 360 365

Lys Tyr Asp Arg Ser Thr Phe Tyr Thr Met Ser Ala Glu Gly Tyr Thr  
 370 375 380

Asp Tyr Pro Thr Tyr Glu Glu Ala Val Asp Leu Gly Trp Asn Lys Asn  
 385 390 395 400

## REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de aldehídos o alcoholes saturados ópticamente activos de la fórmula (2) a partir de aldehídos  $\alpha$   $\beta$ - insaturados de la fórmula (1) mediante reducción en presencia de una enoato-reductasa

(i) con la secuencia de polipéptidos SEQ ID NO:1 o 2, o

5 (ii) con una secuencia de polipéptidos la cual exhibe por lo menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1 o 2.



donde  $R^1$  y  $R^2$  significan independientemente uno de otro H, alquilo  $C_1$ - $C_4$ ,  $R^3$  significa H, alquilo o alqueno  $C_1$ - $C_6$  en forma ramificada y no ramificada.

10 2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** se ejecuta la reducción con NADPH como cofactor.

3. Método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el cofactor empleado es regenerado enzimáticamente.

4. Método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la regeneración del cofactor ocurre mediante glucosa-deshidrogenasa.

5. Método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** se realiza la reducción en un sistema acuoso.

15 6. Método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la enoato-reductasa está presente inmovilizada.

7. Empleo de una enoato-reductasa

(i) con las secuencias de polipéptidos SEQ ID NO:1 o 2, o

(ii) con una secuencia de polipéptidos que exhibe por lo menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1 o 2,

20 en un método para la producción de (R)-(+)-citronelal a partir de citral.