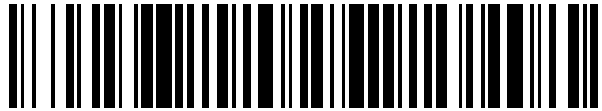


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 487 218**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/24** (2006.01)

**C12P 41/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2011 E 11703175 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2531606**

54 Título: **Procedimiento de reducción de derivados de cinamaldehído usando enoato reductasas**

30 Prioridad:

**01.02.2010 EP 10152321**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.08.2014**

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)  
67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es:

**HAUER, BERNHARD;  
STÜRMER, RAINER;  
STÜCKLER, CLEMENS y  
FABER, KURT**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 487 218 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de reducción de derivados de cinamaldehído usando enoato reductasas

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento catalizado enzimáticamente de producción de aldehídos aromáticos asimétricos en un medio de reacción acuoso que contiene determinados cosolventes orgánicos.

5 **Antecedentes de la invención**

Debido a su volatilidad y a sus propiedades olfativas, los aldehídos constituyen importantes principios activos en aplicaciones de perfumes y aromas (a) C. Chapuis, D. Jacoby, Appl. Catal. A: Gen. 2001, 221, 93-117; b) D. Pybus, C. Sell, The chemistry of fragrances, RSC Paperbacks, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999). Dado que los enantiómeros de aldehídos  $\alpha$ - y  $\beta$ -sustituidos a menudo difieren considerablemente en el olor (a) A. Abate, E. Brenna, C. Fuganti, F. G. Gatti, S. Serra, Chem. Biodivers. 2004, 1, 1888-1898; b) L. Doszczak, P. Kraft, H.-P. Weber, R. Bertermann, A. Triller, H. Hatt, R. Tacke, Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 3367-3371; c) E. Brenna, C. Fuganti, S. Serra, Tetrahedron: Asymmetry 2003, 14, 1-42), a menudo se requiere su aplicación en forma no racémica. Aunque los aldehídos  $\beta$ -sustituidos son quiralmente estables, los análogos  $\alpha$ -sustituidos son propensos a la racemización, que requiere procedimientos sofisticados para su preparación. Entre ellos, la desimetrización de enales conjugados a través de hidrogenación simétrica es el procedimiento de elección (L. A. Saudan, Acc. Chem. Res. 2007, 40, 1309-1319). Aunque se han informado numerosos protocolos que usan homogéneo modificado quiralmente (metal de transición) que contiene catalizadores (Por ejemplo véase: a) S. Akutagawa, Appl. Catal. A: Gen. 1995, 128, 171-207; b) S. Bovo, A. Scrivanti, M. Bertoldini, V. Beghetto, O. Matteoli, Synthesis 2008, 2547-2550; c) W. S. Knowles, R. Noyori, Acc. Chem. Res. 2007, 40, 1238-1239; d) A. J. Minnaard, B. L. Feringa, L. Lefort, J. G. de Vries, Acc. Chem. Res. 2007, 40, 1267-1277), organocatalizadores independientes de metales para la reducción de enales a expensas de un mimético de nicotinamida (‘éster de Hantzsch’) como fuente de hidruro se desarrollaron más recientemente (a) J. W. Yang, M. T. H. Fonseca, N. Vignola, B. List, Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 108-110; b) H. Adolfsson, Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 3340-3342; c) S. G. Ouellet, A. M. Walji, D. W. C. MacMillan, Acc. Chem. Res. 2007, 40, 1327-1339; d) K. Akagawa, H. Akabane, S. Sakamoto, K. Kudo, Tetrahedron: Asymmetry 2009, 20, 461-466). Hasta la fecha, los catalizadores heterogéneos de superficie modificada quiralmente no son competitivos (a) D. J. Watson, R. J. B. R. J. Jesudason, S. K. Beaumont, G. Kyriakou, J. W. Burton, R. M. Lambert, J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 14584-14589; b) A. Tunlger, E. Sipos, V. Hada, Curr. Org. Chem. 2006, 10, 1569-1583). Como una alternativa a la diversidad de procedimientos quimocatalíticos, se ha concebido biorreducción mediante el uso de diversos tipos de enzimas redox (S. Serra, C. Fuganti, E. Brenna, Trends Biotechnol. 2005, 23, 193-198). Con el fin de eludir la purificación tediosa de proteínas y el reciclado de cofactores externos, se usaron células microbianas enteras – levadura de panadero más importante – para la reducción de enales. Debido a la presencia de eno- y carbonil-reductasas conflictivas, la biorreducción quimio- y estereoselectiva de enales fue imposible, debido a que la reducción de carbonilo no deseada siempre anulaba la reducción del enlace C=C deseado, causando por lo tanto la supresión de sustrato y de producto a través de formación de los alcoholes alílicos y/o saturados correspondientes (a) M. Majeric, A. Avdagic, Z. Hamersak, V. Sunjic, Biotechnol. Lett. 1995, 17, 1189-1194; C. Fuganti, S. Serra, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 2000, 3758-3764; c) P. D’Arrigo, C. Fuganti, G. Pedrocchi-Fantoni, S. Servi, Tetrahedron 1998, 54, 15017-15026; d) G. Fronza, C. Fuganti, P. Grasselli, L. Majori, G. Pedrocchi-Fantoni, F. Spreafico, J. Org. Chem. 1982, 47, 3289-3296; e) G. Fronza, C. Fuganti, M. Pinciroli, S. Serra, Tetrahedron: Asymmetry 2004, 15, 3073-3077; f) V. Sunjic, M. Majeric, Z. Hamersak, Croat. Chem. Acta 1996, 69, 643-660).

No fue hasta recientemente que las eno-reductasas estables en oxígeno de la familia de Enzimas Old Yellow llegaron a estar disponibles en cantidades suficientes que permitieran la biorreducción quimio y estereoselectiva de enlaces C=C activados en enonas y enales al dejar restos de C=O intactos (para una revisión véase: a) R. Stuermer, B. Hauer, M. Hall, K. Faber, Curr. Opin. Chem. Biol. 2007, 11, 203-213; b) S. K. Padhi; D. J. Bougioukou, J. D. Stewart, J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 3271-3280; J. F. Chaparro-Riggers, T. A. Rogers, E. Vazquez-Figueroa, K. M. Polizzi, A. S. Bommarius, Adv. Synth. Catal. 2007, 349, 1521-1531; d) M. Kataoka, A. Kotaka, R. Thiwthong, M. Wada, S. Nakamori, S. Shimizu, J. Biotechnol. 2004, 114, 1-9. Para la biorreducción estereoselectiva de  $\alpha$ -metilcinamaldehído usando las enzimas OYE 1-3 y el isopropanol cosolvente véase: A. Müller, B. Hauer, B. Rosche, Biotechnol. Bioeng. 2007, 98, 22-29). Alentados por los resultados recientes (a) M. Hall, C. Stueckler, W. Kroutilo, P. Macheroux, K. Faber, Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 3934-3937; b) M. Hall, C. Stueckler, H. Ehammer, E. Pointner, G. Oberdorfer, K. Gruber, B. Hauer, R. Stuermer, W. Kroutilo, P. Macheroux, K. Faber, Adv. Synth. Catal. 2008, 350, 411-418; c) M. Hall, C. Stueckler, B. Hauer, R. Stuermer, T. Friedrich, M. Breuer, W. Kroutilo, K. Faber, Eur. J. Org. Chem. 2008, 1511-1516.), los inventores han investigado la aplicación de estas enzimas para la preparación de derivados de  $\alpha$ -metil dihidrocinamaldehído no racémicos usados en aplicaciones de perfumería (para la biorreducción estereoselectiva de  $\alpha$ -metilcinamaldehído usando las enzimas OYE 1-3 y el isopropanol cosolvente véase: A. Müller, B. Hauer, B. Rosche, Biotechnol. Bioeng. 2007, 98, 22-29).

Aún existe la necesidad de procedimientos enzimáticos mejorados para preparar formas enantioméricas de derivados de cinamaldehído.

**Sumario de la invención**

Este problema se resolvió, sorprendentemente, proporcionando un procedimiento catalizado enzimáticamente tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

5 En particular, derivados de cinamaldehído no racémicos, tal como por ejemplo derivados de  $\alpha$ -metildihidrocinaldehído, usados como principios olfativos en perfumes (Lilial™, Helional™) se obtuvieron de acuerdo con la invención a través de reducción enzimática de los precursores correspondientes (es decir precursor de cinamaldehído) usando diferentes eno-reductasas clonadas y sobre expresadas. Las OYE 1-3 proporcionan (*S*)-aldehídos con hasta un e.e. de un 97 % en condiciones de reacción optimizadas en presencia de *t*-butil metil éter como cosolvente. El resultado estereoquímico de la reducción de  $\alpha$ -metilcinamaldehído usando NCR y OYE1-3 [que anteriormente se informó que era (*R*)] se corrigió inequívocamente para que fuera (*S*).

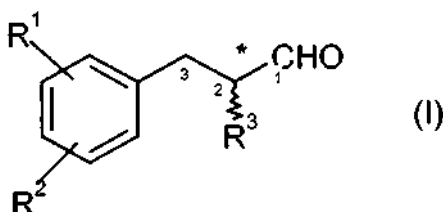
**Descripción de las figuras:**

**Figura 1.** Dependencia de la velocidad de reacción y de la estereoselectividad sobre la proporción de cosolvente orgánico (*t*-BuOMe, v:v) en la reducción de **1a** usando OYE3.

**Descripción detallada de la invención****15 1. Realizaciones específicas**

La presente invención, en particular, se refiere a las siguientes realizaciones:

En una primera realización, la presente invención proporciona un procedimiento catalizado enzimáticamente de producción, en particular la síntesis asimétrica, de un compuesto aldehído de fórmula general I



20 en la que

$R^1$  y  $R^2$  independientemente el uno del otro representan alquilo opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, tal como alquilo  $C_1-C_8$  o  $C_1-C_6$ ; alquenilo, tal como alquenilo  $C_2-C_8$  o  $C_2-C_6$ ; alquinilo, tal como alquinilo  $C_2-C_8$  o  $C_2-C_6$ ; alcoxi, tal como alcoxi  $C_1-C_8$  o  $C_1-C_6$ ; alquenilo, tal como alquenilo  $C_2-C_8$  o  $C_2-C_6$ ; -H, -OH, -SH, -halógeno, tal como F, Cl o Br;  $-NH_2$ , o  $-NO_2$ ;

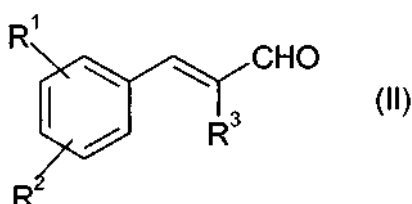
25 en particular, H o alquilo lineal o ramificado, tal como alquilo  $C_1-C_6$  o  $C_1-C_4$ ; alquenilo, tal como alquenilo  $C_2-C_6$ ; alquinilo, tal como alquinilo  $C_2-C_6$ ; alcoxi, tal como alcoxi  $C_1-C_6$  o  $C_1-C_4$ ; alquenilo, tal como  $C_2-C_6$  alquenilo; o más particularmente H o alquilo  $C_3-C_6$  ramificado o alquenilo  $C_3-C_6$ ;

30 o  $R^1$  y  $R^2$  representan conjuntamente un grupo de fórmula  $-O-R^4-O-$ , en la que  $R^4$  representa un alqueno opcionalmente sustituido, tal como alqueno o alquenilo  $C_1-C_4$ , tal como alquenilo  $C_2-C_6$  o  $C_3-C_6$ ; y  $R^3$  representa alquilo, tal como alquilo  $C_1-C_6$ ; o alcoxi, tal como alcoxi  $C_1-C_6$ , en particular alquilo  $C_1-C_4$ ;

en el que dicho compuesto, que contiene un átomo de carbono asimétrico en la posición 2, está en la configuración (*R*) o (*S*);

cuyo procedimiento comprende:

35 a) reducir enzimáticamente (en presencia o en ausencia de oxígeno molecular, es decir por vía aerobia o por vía anaerobia) un compuesto de fórmula II (en particular en la configuración E),



en la que

$R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  son tal como se han definido anteriormente,

en un medio de reacción acuoso que comprende, en una proporción de un 5 a un 40 % en vol. como un

cosolvente, al menos un compuesto de éter no simétrico de fórmula III



en la que

5 uno de los restos  $\text{R}^5$  y  $\text{R}^6$  es un grupo alquilo  $\text{C}_3 - \text{C}_8$  ramificado, y el otro es un grupo alquilo  $\text{C}_1 - \text{C}_6$  y además contiene al menos una enzima reductasa y al menos un cofactor; en el que dicha reductasa se selecciona entre el grupo que consiste en

i) OYE1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, o una secuencia idéntica en al menos un 60 % con dicha SEC ID N°: 1 y que es capaz de hidrogenar un compuesto de fórmula II en la posición C2/C3;

10 ii) OYE2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, o una secuencia idéntica en al menos un 60 % con dicha SEC ID N°: 2 y que es capaz de hidrogenar un compuesto de fórmula II en la posición C2/C3;

15 iii) OYE3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, o una secuencia idéntica en al menos un 60 % con dicha SEC ID N°: 3 y que es capaz de hidrogenar un compuesto de fórmula II en la posición C2/C3;

y

b) opcionalmente aislar dicho compuesto de fórmula I en forma de un estereoisómero básicamente puro o en forma de una mezcla de estereoisómeros.

20 El procedimiento de dicha realización, en el que dicho cosolvente es un t-butil alquil éter, en particular un t-butil alquil  $\text{C}_1\text{-C}_4$  éter, tal como t-butil metil éter.

El procedimiento de una de las realizaciones precedentes, en el que dicha reductasa se selecciona entre el grupo que consiste en

25 a) OYE1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, o una secuencia idéntica en al menos un 60 % con dicha SEC ID N°: 1, tal como por ejemplo al menos una identidad de secuencia de un 70, un 80, un 85, un 90, un 92, un 95, un 96, un 97, un 98, o un 99 %, y que además mantiene la actividad enzimática pretendida (o función), es decir que se puede aplicar como enzima reductasa, en particular como reductasa capaz de reducir, es decir hidrogenar, un compuesto de fórmula II en la posición C2/C3 (y opcionalmente también oxidar, es decir deshidrogenar, un compuesto de fórmula I en la posición C2/C3);

30 b) OYE2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, o una secuencia idéntica en al menos un 60 % con dicha SEC ID N°: 2, tal como por ejemplo al menos una identidad de secuencia de un 70, un 80, un 85, un 90, un 92, un 95, un 96, un 97, un 98, o un 99 %, y que además mantiene la actividad enzimática pretendida (o función), es decir que se puede aplicar como enzima reductasa, en particular como reductasa capaz de reducir, es decir hidrogenar, un compuesto de fórmula II en la posición C2/C3 (y opcionalmente también oxidar, es decir deshidrogenar, un compuesto de fórmula I en la posición C2/C3);

35 c) OYE3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, o una secuencia idéntica en al menos un 60 % con dicha SEC ID N°: 3, tal como por ejemplo al menos una identidad de secuencia de un 70, un 80, un 85, un 90, un 92, un 95, un 96, un 97, un 98, o un 99 %, y que además mantiene la actividad enzimática pretendida (o función), es decir que se puede aplicar como enzima reductasa, en particular como reductasa capaz de reducir, es decir hidrogenar, un compuesto de fórmula II en la posición C2/C3 (y opcionalmente también oxidar, es decir deshidrogenar, un compuesto de fórmula I en la posición C2/C3).

Cada una de dichas enzimas pertenece a la clase de las enoato reductasas (EC 1.3.1.X).

En particular, estas enzimas tienen el siguiente origen:

OYE1: *Saccharomyces carlsbergensis*,  
OYE2 y OYE3: *Saccharomyces cerevisiae*

45 El procedimiento de una de las realizaciones precedentes, en el que la reacción se realiza en presencia de NADH o NADPH como equivalente o cofactor de reducción (o la correspondiente reacción inversa en presencia de  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ ).

El procedimiento de una de las realizaciones precedentes, en el que la reacción de reducción se acopla a una reacción de reciclado de cofactor, en particular una reacción de reciclado de cofactor enzimático.

50 El procedimiento de la última realización, en el que el cofactor  $\text{NAD}^+$  oxidado se recicla por acoplamiento a la oxidación de glucosa catalizada por la glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.47), formando de este modo gluconolactona y regenerando NADH.

El procedimiento de una de las realizaciones precedentes, en el que las enzimas implicadas están presentes en el medio de reacción en forma disuelta, dispersa o inmovilizada.

El procedimiento de una de las realizaciones precedentes, en el que el medio de reacción se tampona a un pH en el intervalo de 6,5 a 8,5, tal como de 7,0 a 8,0.

El procedimiento de una de las realizaciones precedentes, en el que la temperatura de reacción está en el intervalo de 5 a 60, de 10 a 50, o en particular de 20 a 40 °C.

- 5 La invención también incluye la reacción inversa correspondiente de la conversión tal como se define en las realizaciones, es decir, la oxidación biocatalítica (deshidrogenación) de un compuesto de fórmula I a un compuesto de fórmula II.

## 2. Explicación de términos particulares

A menos que se indique de otro modo, se aplicarán los siguientes significados:

- 10 El término procedimiento "biocatalítico" o "catalizado enzimáticamente" se refiere a cualquier procedimiento realizado en presencia de actividad catalítica de una enzima tal como se define en el presente documento, es decir en presencia de enzima aislada pura o en bruto o células microbianas enteras que contienen o que expresan dicha actividad enzimática.

- 15 El término "estereoespecífico" se refiere a que uno de varios estereoisómeros o enantiómeros se forma mediante la enzima con un exceso o pureza altamente enantiomérica, de al menos un ee de un 90 %, preferentemente al menos un ee de un 95 %, en particular al menos un ee de un 98 %, o al menos un ee de un 99 %. El valor de ee en % se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula

$$\% \text{ de ee} = [X_A - X_B] / [X_A + X_B] * 100,$$

en la que  $X_A$  y  $X_B$  se refieren a la fracción molar del enantiómero A o B, respectivamente.

- 20 Ejemplos de "estereoisómeros" son los isómeros *E* y *Z* o, en particular los enantiómeros *R* y *S*.

La expresión "básicamente puro" se refiere a la descripción de una molécula, que es homogénea en una o más características de pureza u homogeneidad usadas por los expertos en la materia.

- 25 Una proteína o enzima "básicamente pura" se refiere a que la proteína purificada deseada está básicamente libre de componentes celulares contaminantes, tal como se pone en evidencia mediante una sola banda después de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Una enzima o proteína "básicamente pura" mostrará características constantes y reproducibles dentro de las desviaciones experimentales estándar para parámetros tales como los siguientes: masa molecular, migración cromatográfica, composición de aminoácidos, secuencia de aminoácidos, extremo N bloqueado o sin bloquear, perfil de elución por HPLC, actividad biológica, y otros parámetros mencionados. Por ejemplo, una proteína o enzima "básicamente pura" se refiere a que la proteína purificada deseada está básicamente libre de componentes celulares contaminantes, tal como se pone en evidencia mediante una sola banda después de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Sin embargo, la expresión no pretende excluir mezclas artificiales o sintéticas de dicha enzima o proteína con otros compuestos. Además, la expresión no pretende excluir proteínas de fusión aisladas opcionalmente a partir de un huésped recombinante.

- 35 Dentro de los compuestos químicos de fórmulas I, II y III, se aplicarán los siguientes significados:

**Alquilo así como de restos de fragmento alquilo derivados de los mismos, tal como por ejemplo alcoxi,** representan cadenas de hidrocarburo lineal o ramificado, saturado que tienen de 1 a 4, de 1 a 6, de 1 a 8, o de 1 a 10 átomos de carbono, tal como

- 40 **Alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>** tal como metilo, etilo, propilo, 1-metiletilo, butilo, 1-metil-propilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo, pentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, hexilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetil-butilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 1,1,2-tri-metilpropilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1-etil-1-metilpropilo y 1-etil-2-metilpropilo.

- 45 **Alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>**, tal como **alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>**, tal como por ejemplo metoxi, etoxi, n-propoxi, 1-metiletoxi, butoxi, 1-metil-propoxi, 2-metilpropoxi o 1,1-dimetiletoxi; así como por ejemplo pentoxi, 1-metilbutoxi, 2-metilbutoxi, 3-metilbutoxi, 1,1-dimetilpropoxi, 1,2-dimetilpropoxi, 2,2-dimetilpropoxi, 1-etilpropoxi, hexoxi, 1-metilpentoxi, 2-metilpentoxi, 3-metilpentoxi, 4-metilpentoxi, 1,1-dimetilbutoxi, 1,2-dimetilbutoxi, 1,3-dimetilbutoxi, 2,2-dimetilbutoxi, 2,3-dimetilbutoxi, 3,3-dimetilbutoxi, 1-etilbutoxi, 2-etilbutoxi, 1,1,2-trimetilpropoxi, 1,2,2-trimetilpropoxi, 1-etil-1-metil-propoxi o 1-etil-2-metilpropoxi;

- 50 **Alqueno:** restos de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada una o múltiples veces, en particular una vez, que tienen de 2 a 4, de 2 a 6, de 2 a 8, o de 2 a 10 átomos de carbono y un doble enlace en cualquier posición, tal como alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, tal como etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-metiletenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 1-metil-1-

propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-metil-2-propenilo, 2-metil-2-propenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo, 1-metil-1-butenilo, 2-metil-1-butenilo, 3-metil-1-butenilo, 1-metil-2-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 3-metil-2-butenilo, 1-metil-3-butenilo, 2-metil-3-butenilo, 3-metil-3-butenilo, 1,1-dimetil-2-propenilo, 1,2-dimetil-1-propenilo, 1,2-dimetil-2-propenilo, 1-etil-1-propenilo, 1-etil-2-propenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo, 5-hexenilo, 1-metil-1-pentenilo, 2-metil-1-pentenilo, 3-metil-1-pentenilo, 4-metil-1-pentenilo, 1-metil-2-pentenilo, 2-metil-2-pentenilo, 3-metil-2-pentenilo, 4-metil-2-pentenilo, 1-metil-3-pentenilo, 2-metil-3-pentenilo, 3-metil-3-pentenilo, 4-metil-3-pentenilo, 1-metil-4-pentenilo, 2-metil-4-pentenilo, 3-metil-4-pentenilo, 4-metil-4-pentenilo, 1,1-dimetil-2-butenilo, 1,1-dimetil-3-butenilo, 1,2-dimetil-1-butenilo, 1,2-dimetil-2-butenilo, 1,2-dimetil-3-butenilo, 1,3-dimetil-1-butenilo, 1,3-dimetil-2-butenilo, 1,3-dimetil-3-butenilo, 2,2-dimetil-3-butenilo, 2,3-dimetil-1-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, 2,3-dimetil-3-butenilo, 3,3-dimetil-1-butenilo, 3,3-dimetil-2-butenilo, 1-etil-1-butenilo, 1-etil-2-butenilo, 1-etil-3-butenilo, 2-etil-1-butenilo, 2-etil-2-butenilo, 2-etil-3-butenilo, 1,1,2-trimetil-2-propenilo, 1-etil-1-metil-2-propenilo, 1-etil-2-metil-1-propenilo y 1-etil-2-metil-2-propenilo.

**Alqueniloxi:** análogos unidos a oxígeno de los grupos alquenilo anteriores, tales como los grupos alqueniloxi C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> correspondientes.

**Alquinilo:** análogos de los grupos alquenilo anteriores en los que un doble enlace carbono-carbono se reemplaza con un triple enlace.

**Alquileo:** fuentes de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tienen hasta 7 átomos de carbono, tal como por ejemplo grupos alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> tales como -CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-, -CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)- o -CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)- o grupos alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> seleccionados entre -CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-, -CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-.

**Alquenileno:** representan a los análogos de los grupos alquileo mencionados anteriormente no saturados una vez o múltiples veces, en particular, no saturados una vez, que tienen de 2 a 8 átomos de carbono, en particular alquenilenos C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub> o alquenilenos C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, tales como -CH=CH-, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH=CH-, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=CH-, -CH(CH<sub>3</sub>)-CH=CH-, -CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)=CH-.

**Los sustituyentes opcionales** se pueden seleccionar entre -COOH, -COO-alquilo, -OH, -SH, -CN, amino, -NO<sub>2</sub>, alquilo, o alquenilo, alquilo o alquenilo siendo tal como se han definido anteriormente.

### 3. Definiciones adicionales de la invención

#### 3.1 Proteínas

El procedimiento de la presente invención no se limita a las enzimas/proteínas mencionadas específicamente, sino que se extiende también a equivalentes funcionales de las mismas.

Los "equivalentes funcionales" o "análogos" o "mutaciones funcionales" de las enzimas que se desvelan concretamente son diversos polipéptidos de las mismas, que además poseen la función o actividad biológica deseada, por ejemplo actividad enzimática.

Por ejemplo, "equivalentes funcionales" se refiere a enzimas, que, en un ensayo usado para la actividad enzimática, presentan al menos de un 1 a un 10 %, o al menos un 20 %, o al menos un 50 %, o al menos un 75 %, o al menos un 90 % de actividad más elevada o más baja de un enzima, tal como se define en el presente documento.

"Equivalentes funcionales" también se refiere a mutantes en particular, que, en al menos una posición de la secuencia de las secuencias de aminoácidos que se han indicado anteriormente, tienen un aminoácido que es diferente del que se ha indicado concretamente, pero que no obstante poseen una de las actividades biológicas que se han mencionado anteriormente. Por lo tanto, "equivalentes funcionales" comprende los mutantes que se pueden obtener mediante una o más, tal como de 1 a 20, de 1 a 15, de 1 a 10 o de 1 a 5, adiciones, sustituciones, supresiones y/o inversiones de aminoácidos, en los que los cambios indicados se pueden producir en cualquier posición de la secuencia, con la condición de que conduzcan a un mutante con el perfil de propiedades. Además, se proporciona equivalencia funcional en particular si los patrones de reactividad coinciden cualitativamente entre el mutante y el polipéptido sin cambiar, es decir si por ejemplo los mismos sustratos se convierten a una velocidad diferente. Ejemplos de sustituciones adecuadas de aminoácidos se muestran en la siguiente tabla:

Resto original	Ejemplos de sustitución
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu

(continuación)

<b>Resto original</b>	<b>Ejemplos de sustitución</b>
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn ; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg ; Gln ; Glu
Met	Leu ; Ile
Phe	Met ; Leu ; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp ; Phe
Val	Ile; Leu

Los "equivalentes funcionales" en el sentido mencionado anteriormente también son "precursores" de los polipéptidos descritos, así como "derivados funcionales" y "sales" de los polipéptidos.

- 5 En ese caso, los "precursores" son precursores naturales o sintéticos de los polipéptidos con o sin la actividad biológica deseada.

La expresión "sales" se refiere a sales de grupos carboxilo así como a sales de adición ácida de grupos amino de las moléculas de proteína. Las sales de grupos carboxilo se pueden producir de una manera conocida y comprenden sales inorgánicas, por ejemplo sales de sodio, calcio, amonio, hierro y cinc, y sales con bases orgánicas, por ejemplo aminas, tales como trietanolamina, arginina, lisina, piperidina y similares. Además, se desvelan sales de adición ácida, por ejemplo sales con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y sales con ácidos orgánicos, tales como ácido acético y ácido oxálico.

10

Además, se pueden producir "derivados funcionales" de polipéptidos en grupos laterales con funcionalidad de aminoácido o en su extremo N-terminal o C-terminal usando técnicas conocidas. Dichos derivados comprenden por ejemplo ésteres alifáticos de grupos ácido carboxílico, amidas de grupos ácido carboxílico, que se pueden obtener por reacción con amoníaco o con una amina primaria o secundaria; derivados de N-acilo de grupos amino libre, producidos por reacción con grupos acilo; o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libre, producidos por reacción con grupos acilo.

15

Además, "equivalentes funcionales" naturalmente comprenden polipéptidos que se pueden obtener a partir de otros organismos, así como variantes de origen natural. Por ejemplo, se pueden establecer áreas de regiones de secuencias homólogas mediante comparación de secuencias, y se pueden determinar enzimas equivalentes en base a los parámetros concretos.

20

Además, "equivalentes funcionales" también comprende fragmentos, preferentemente dominios individuales o motivos de secuencia, de los polipéptidos, que por ejemplo presentan una función biológica deseada.

Además, los "equivalentes funcionales" son proteínas de fusión, que tienen una de las secuencias de polipéptidos que se han indicado anteriormente o equivalentes funcionales derivadas de las mismas y al menos una secuencia heteróloga adicional, funcionalmente diferente en asociación funcional N-terminal o C-terminal (es decir sin alteración funcional mutua sustancial de las partes de la proteína de fusión). Los ejemplos no limitantes de estas secuencias heterólogas son por ejemplo péptidos de señal, anclas de histidina o enzimas.

25

Los "equivalentes funcionales" son homólogos de las proteínas que se han desvelado concretamente. Éstos poseen valores de porcentaje de identidad tal como se ha indicado anteriormente. Dichos valores se refieren a la identidad con las secuencias de aminoácidos que se han desvelado concretamente, y se pueden calcular de acuerdo con el algoritmo de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85 (8), 1988, 2444-2448.

30

Los valores del porcentaje de identidad también se pueden calcular a partir de alineamientos de BLAST, algoritmo

blastp (BLAST de proteína-proteína) o mediante la aplicación del ajuste de Clustal tal como se proporciona a continuación. Los valores habituales de porcentaje de identidad están por ejemplo en el intervalo de un 50 % o superior, tal como por ejemplo al menos un 60, un 70, un 80, un 85, un 90, un 91, un 92, un 93, un 94, un 95, un 96, un 97, un 98 o un 99 %.

- 5 Un porcentaje de identidad de un polipéptido homólogo se refiere en particular al porcentaje de identidad de los restos de aminoácidos con respecto a la longitud total de una de las secuencias de aminoácidos que se describen concretamente en el presente documento.

10 En el caso de una posible glicosilación de proteína, los "equivalentes funcionales" comprenden proteínas del tipo que sea designado anteriormente en forma desglucosilada o glicosilada así como formas modificadas que se pueden obtener por alteración del patrón de glicosilación.

Dichos equivalentes u homólogos funcionales de las proteínas o polipéptidos se pueden producir por mutagénesis, por ejemplo por mutación puntual, alargamiento o acortamiento de la proteína.

15 Dichos equivalentes u homólogos funcionales de las proteínas se pueden identificar por identificación sistemática de bases de datos combinatorios de mutantes, por ejemplo mutantes de acortamiento. Por ejemplo, una base de datos variegada de variantes de proteínas se puede producir por mutagénesis combinatoria al nivel del ácido nucleico, por ejemplo por ligadura enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos. Existe un gran número de procedimientos que se pueden usar para la producción de bases de datos de homólogos potenciales a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerados. La síntesis química de una secuencia genética degenerada se puede realizar en un sintetizador de ADN automático, y el gen sintético se puede ligar a continuación en un vector de expresión adecuado. El uso de un genoma degenerado hace posible suministrar todas las secuencias en una mezcla, que codifica el conjunto deseado de secuencias de proteínas potenciales. Una persona experta en la materia conoce los procedimientos de síntesis de oligonucleótidos degenerados (por ejemplo, Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura y col. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura y col. (1984) Science 198:1056; Ike y col. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

25 En la técnica anterior, se conocen varias técnicas para la identificación sistemática de productos genéticos de bases de datos combinatorios, que se produjeron por mutaciones puntuales o acortamiento, y para la identificación sistemática de bibliotecas de ADNc para productos genéticos con una propiedad seleccionada. Estas técnicas se pueden adaptar para la identificación sistemática rápida de los bancos genéticos que se produjeron por mutagénesis combinatoria de homólogos. Las técnicas usadas más frecuentemente para identificación sistemática de grandes bancos genéticos, que se basan en un análisis de alto rendimiento, comprenden la clonación del banco genético en vectores de expresión que se pueden replicar, transformación de las células adecuadas con la base de datos del vector resultante y expresión de los genes combinatorio sin condiciones en las que la detección de la actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La Mutagénesis de Conjunto Recursiva (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en las bases de datos, se puede usar en combinación con los ensayos de identificación sistemática, para identificar homólogos (Arkin e Yourvan (1992) PNAS 89: 7811-7815; Delgrave y col. (1993) Protein Engineering 6 (3): 327-331).

### 3.2 Codificación de secuencias de ácidos nucleicos

Además, se desvelan secuencias de ácidos nucleicos que codifican enzimas/proteínas tal como se define en el presente documento.

40 Además, se desvelan ácidos nucleicos con un determinado grado de "identidad" con las secuencias que se desvelan específicamente en el presente documento. "Identidad" entre dos ácidos nucleico se refiere a la identidad de los nucleótidos, en cada caso sobre toda la longitud del ácido nucleico.

45 Por ejemplo, la identidad se puede calcular por medio del programa Vector NTI Suite 7.1 de la compañía Informax (USA) usando el Procedimiento Clustal (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. Abril de 1989; 5 (2): 151-1) con los siguientes ajustes:

#### Parámetros de alineamiento múltiple:

Penalización por apertura del hueco	10
Penalización por extensión del hueco	10
Intervalo de penalización por separación del hueco	8
Penalización por separación del hueco	apagado
% de identidad para el retraso del alineamiento	40
Huecos específicos del resto	apagado
Hueco del resto hidrofílico	apagado



(continuación)

Parámetros de alineamiento múltiple:

Pesada de transición 0

Parámetro de alineamiento por pares:

Algoritmo FAST encendido  
 Tamaño K-tuple 1  
 Penalización del hueco 3  
 Tamaño de ventana 5  
 Número de mejores diagonales 5

5 Como alternativa, la identidad se puede determinar de acuerdo con Chenna, Ramu, Sugawara, Hideaki, Koike, Tadashi, Lopez, Rodrigo, Gibson, Toby J, Higgins, Desmond G, Thompson, Julie D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. (2003) *Nucleic Acids Res* 31 (13): 3497-500, la página web: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html#> y los siguientes ajustes

Penalización por apertura del hueco de ADN 15,0  
 Penalización por extensión del hueco de ADN 6,66  
 Matriz de ADN Identidad  
 Penalización por apertura del hueco de proteína 10,0  
 Penalización por extensión del hueco de proteína 0,2  
 Matriz de proteína Gonnet  
 ENDGAP de proteína/ADN -1  
 GAPDIST de proteína/ADN 4

10 Todas las secuencias de ácidos nucleicos que se mencionan en el presente documento (secuencias de ADN y de ARN monocatenario y bicatenario, por ejemplo ADNc y ARNm) se pueden producir de una manera conocida mediante síntesis química a partir de los componentes básicos de nucleótidos, por ejemplo por condensación de fragmentos de solvatación individual, componentes básicos de ácidos nucleicos complementarios de la doble hélice. La síntesis química de oligonucleótidos, por ejemplo, se puede realizar de una manera conocida, mediante el procedimiento de fosfoamidita (Voet, Voet, 2ª edición, Wiley Press, Nueva York, páginas 896-897). La acumulación de oligonucleótidos sintéticos y relleno de huecos por medio del fragmento Klenow de la ADN polimerasa y reacciones de ligadura así como técnicas de clonación generales se describen en Sambrook y *col.* (1989), véase a continuación.

20 Además, se desvelan secuencias de ácidos nucleicos (secuencias de ADN y de ARN monocatenario y bicatenario, por ejemplo ADNc y ARNm), que codifican uno de los polipéptidos anteriores y sus equivalentes funcionales, que se pueden obtener por ejemplo usando análogos de nucleótidos artificiales.

La divulgación se refiere tanto a moléculas aisladas de ácido nucleico, que codifican polipéptidos o proteínas o segmentos biológicamente activos de los mismos, como a fragmentos de ácidos nucleicos, que se pueden usar por ejemplo como sondas o cebadores de hibridación para identificar o amplificar la codificación de ácidos nucleicos.

25 Además, las moléculas de ácido nucleico pueden contener secuencias no traducidas del extremo 3' y/o 5' de la región de codificación genética.

Además, se desvelan a moléculas de ácidos nucleicos que son complementarias con las secuencias de nucleótidos que se han descrito concretamente o un segmento de las mismas.

30 Las secuencias de nucleótidos hacen posible la producción de sondas y cebadores que se pueden usar para la identificación y/o clonación de secuencias homólogas en otros tipos y organismos celulares. Dichas sondas observadores comprenden generalmente una región de la secuencia de nucleótidos que se hibridan en condiciones "estrictas" (véase a continuación) o sobre al menos aproximadamente 12, preferentemente al menos aproximadamente 25, por ejemplo aproximadamente 40, 50 o 75 nucleótidos sucesivos de una hebra sentido de una

secuencia de ácidos nucleicos o de una hebra antisentido correspondiente.

Una molécula "aislada" de ácido nucleico se separa de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico y que además pueden estar básicamente libres de otro material celular o medios de cultivo, si se está produciendo mediante técnicas recombinantes, o puede estar libre de precursores químicos u otros agentes químicos, si se está sintetizando químicamente.

Una molécula de ácido nucleico se puede aislar por medio de técnicas convencionales de biología molecular y la información de la secuencia proporcionada. Por ejemplo, el ADNc se puede aislar a partir de una biblioteca de ADN adecuada, usando una de las secuencias completas que se ha desvelado concretamente o un segmento de la misma como sonda de hibridación y técnicas de hibridación convencionales (tal como se describe por ejemplo por Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Además, una molécula de ácido nucleico que comprende una de las secuencias desveladas o un segmento de las mismas, se puede aislar mediante la reacción en cadena de la polimerasa, usando los cebadores de oligonucleótidos que se construyeron sobre la base de esta secuencia. El ácido nucleico amplificado de este modo se puede clonar en un vector adecuado y se puede caracterizar mediante secuenciación de ADN. Los oligonucleótidos también se pueden producir mediante procedimientos de síntesis convencionales, por ejemplo usando un sintetizador de ADN automático.

Las secuencias de ácidos nucleicos o derivados de las mismas, homólogos o partes de estas secuencias, se pueden aislar por ejemplo mediante técnicas de hibridación habituales o mediante la técnica de PCR a partir de otras bacterias, por ejemplo a través de bibliotecas genómica o de ADNc. Estas secuencias de ADN hibridan en condiciones convencionales con las secuencias.

"Hibridar" se refiere a la capacidad de un polinucleótido o oligonucleótido para unirse a una secuencia casi complementaria en condiciones convencionales, aunque la unión no específica no se produce entre compañeros no complementarios en estas condiciones. Por esto, las secuencias pueden ser complementarias en un 90-100 %. La propiedad de las secuencias complementarias de ser capaces de unirse específicamente entre sí se usa por ejemplo en Transferencia de Northern o en Transferencia de Southern o en unión de cebadores en PCR o RT-PCR.

Los oligonucleótidos cortos de las soluciones conservadas se usan ventajosamente para la hibridación. Sin embargo, también es posible usar fragmentos más largos de los ácidos nucleicos o de las secuencias completas para la hibridación. Estas condiciones convencionales varían dependiendo del ácido nucleico usado (oligonucleótido, fragmento más largo o secuencia completa) o dependiendo de que tipo de ácido nucleico – ADN o ARN - se usa para la hibridación. Por ejemplo, las temperaturas de fusión para los híbridos de ADN:ADN son aprox. 10 °C más bajas que las de los híbridos de ADN:ARN de la misma longitud.

Por ejemplo, dependiendo del ácido nucleico en particular, condiciones convencionales se refiere a temperaturas entre 42 y 58 °C en una solución acuosa de tampón con una concentración entre 0,1 y 5 x SSC (1 X SSC = NaCl 0,15 M, citrato sódico 15 mM, pH 7,2) o adicionalmente en presencia de formamida al 50 %, por ejemplo a 42 °C en 5 x SSC, formamida al 50 %. De forma ventajosa, las condiciones de hibridación para los híbridos de ADN:ADN son 0,1 x SSC y temperaturas entre aproximadamente 20 °C y 45 °C, preferentemente entre aproximadamente 30 °C y 45°C. Para los híbridos de ADN:ARN, las condiciones de hibridación son ventajosamente 0,1 x SSC y las temperaturas entre aproximadamente 30 °C y 55 °C, preferentemente entre aproximadamente 45 °C y 55 °C. Estas temperaturas indicadas para la hibridación son ejemplos valores calculados de temperatura de fusión para un ácido nucleico con una longitud de aprox. 100 nucleótidos y un contenido de G + C de un 50 % en ausencia de formamida. Las condiciones experimentales para la hibridación de ADN se describen en libros de texto de genética relevantes, por ejemplo Sambrook *y col.*, 1989, y se pueden calcular usando fórmulas que son conocidas por un experto en la materia, por ejemplo dependiendo de la longitud de los ácidos nucleicos, el tipo de híbridos o el contenido de G + C. Un experto en la materia puede obtener información adicional sobre hibridación a partir de los siguientes libros de texto: Ausubel *y col.* (eds), 1985, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley e Hijos, Nueva York; Hames e Higgins (eds), 1985, *Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach*, IRL Press en Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, IRL Press en Oxford University Press, Oxford.

La "hibridación" se puede realizar en particular en condiciones estrictas. Dichas condiciones de hibridación se describen, por ejemplo, en Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., en: *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, páginas 9.31-9.57 o en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley e Hijos, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

Las condiciones de hibridación "estrictas" se refieren en particular a: Incubación a 42 °C durante una noche en una solución que consiste en formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 750 mM, citrato tri-sódico 75 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x Solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 % y 20 g/ml de ADN desnaturalizado de esperma de salmón cortado, seguido de lavados de los filtros con 0,1 x SSC a 65 °C.

Además, se desvelan derivados de las secuencias de ácidos nucleicos en concreto que se desvelan o que se pueden derivar.

Por lo tanto, las secuencias de ácidos nucleicos adicionales pueden tener su origen en las secuencias que se desvelan específicamente en el presente documento y se pueden diferenciar de ellas por adición, sustitución, inserción o supresión de nucleótidos individuales o de varios nucleótidos, y además codifican polipéptidos con el perfil deseado de propiedades.

5 Además, se desvelan secuencias de ácidos nucleicos que comprenden las llamadas mutaciones silenciosas o que se han alterado, en comparación con una secuencia que se indica en concreto, de acuerdo con el uso de codones de un organismo original o huésped especial, así como variantes de origen natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas, de los mismos.

10 Además, se desvelan secuencias que se pueden obtener por sustituciones de nucleótidos conservativas (es decir, el aminoácido en cuestión se sustituye por un aminoácido de la misma carga, tamaño, polaridad y/o solubilidad).

Además, se desvelan moléculas que tienen su origen en los ácidos nucleicos se desvelan concretamente por polimorfismos de secuencia. Estos polimorfismos genéticos pueden existir entre individuos dentro de una población debido a la variación natural. Estas variaciones naturales producen normalmente una varianza de un 1 a un 5 % en la secuencia de nucleótidos de un gen.

15 Los derivados de secuencias de ácidos nucleicos se refieren, por ejemplo, a variantes alélicas, que tienen una homología de al menos un 60 % al nivel del aminoácido derivado, preferentemente una homología de al menos un 80 %, de forma muy especialmente preferente una homología de al menos un 90 % sobre todo el intervalo de la secuencia (con respecto a homología a nivel del aminoácido, se debería hacer referencia a los detalles que se han proporcionado anteriormente para los polipéptidos). De forma ventajosa, las homologías pueden ser más elevadas sobre las regiones parciales de las secuencias.

20 Además, también se debe entender que los derivados van a ser homólogos de las secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo homólogos de animales, plantas, hongos o bacterias, secuencias acortadas, ADN o ARN monocatenario de la secuencia de ADN de codificación y de no codificación. Por ejemplo, los homólogos tienen, a nivel del ADN, una homología de al menos un 40 %, preferentemente de al menos un 60 %, de forma especialmente preferente de al menos un 70 %, de forma muy especialmente preferente de al menos un 80 % sobre toda la región del ADN proporcionada en una secuencia que se desvela específicamente en el presente documento.

25 Además, se debe entender que los derivados van a ser, por ejemplo, fusiones con promotores. Los promotores que se añaden a las secuencias de nucleótidos indicadas se pueden modificar por al menos un intercambio de nucleótidos, al menos una inserción, inversión y/o supresión, aunque sin alterar la funcionalidad o la eficacia de los promotores. Además, la eficacia de los promotores puede aumentar mediante la alteración de su secuencia o se puede intercambiar completamente con más promotores eficaces incluso de organismos de un género diferente.

### 3.3 Preparación de mutantes funcionales

El lector experto también es consciente de los seguimientos para generar mutantes funcionales.

35 Dependiendo de la técnica aplicada, un lector experto puede generar mutaciones arbitrarias o dirigidas en genes o regiones no codificantes de ácidos nucleicos (que, por ejemplo, pueden ser de importancia para regular la expresión genética) y, después, puede generar bibliotecas de genes adecuados. Por lo tanto, el procedimiento requirió, por lo tanto, todo lo que se conoce bien en la técnica, y, por ejemplo, se describe en Sambrook y Russell, *Molecular Cloning*. 3. Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.

40 Procedimientos para modificar genes y posteriormente para modificar las proteínas codificadas son bien conocidos por el lector experto, tal como por ejemplo

- mutagénesis específica del sitio en la que los nucleótidos individuales o múltiples de un gen se reemplazan específicamente (Trower MK (Ed.) 1996; *In vitro* mutagenesis protocols. Humana Press, Nueva Jersey),
- mutagénesis de saturación, en la que en cualquier posición de un gen, el codón de cualquier aminoácido se puede intercambiar o añadir (Kegler-Ebo DM, Docktor CM, DiMaio D (1994) *Nucleic Acids Res* 22: 1593; Baretino D, Feigenbutz M, Valcárel R, Stunnenberg HG (1994) *Nucleic Acids Res* 22: 541; Barik S (1995) *Mol Biotechnol* 3:1),
- reacción en cadena de la polimerasa con tendencia al error (PCR), en la que las secuencias de nucleótidos se mutan a través de la acción de una ADN-polimerasa succiona incorrectamente (Eckert KA, Kunkel TA (1990) *Nucleic Acids Res* 18: 3739);
- 50 - procedimiento SeSaM (Procedimiento de Saturación de Secuencia), en el que las sustituciones preferentes se evitan por la polimerasa (Schenk y *col.*, *Biospektrum*, Vol. 3, 2006, 277-279)
- Pase de genes en cepas de mutador, que muestran una mayor incidencia de mutaciones de secuencias de nucleótidos, por ejemplo en vista de un mecanismo defectuoso de reparación de ADN (Greener A, Callahan M, Jerpseth B (1996) An efficient random mutagenesis technique using an E.coli mutator strain. En: Trower MK

(Hrsg.) In vitro mutagenesis protocols. Humana Press, Nueva Jersey), o

- Barajado de ADN, en el que un grupo de genes muy relacionados se forma y se digiere y en el que los fragmentos se usan como moldes para una reacción de PCR, y en el que se forman genes mosaico de longitud completa (Stemmer WPC (1994) Nature 370: 389; Stemmer WPC (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:10747).

5 Mediante la aplicación de la denominada técnica de evolución dirigida (véase por ejemplo Reetz MT y Jaeger K-E (1999), Topics Curr Chem 200: 31; Zhao H, Moore JC, Volkov AA, Arnold FH (1999), Methods for optimizing industrial enzymes by directed evolution, En: Demain AL, Davies JE (Hrsg.) Manual of industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology) un lector experto será capaz de preparar específicamente mutantes funcionales a gran escala. En una primera etapa, se generan bibliotecas de una proteína específica, por  
10 ejemplo, mediante la aplicación de uno cualquiera de los procedimientos que se han mencionado anteriormente. A continuación, dichas bibliotecas se expresan, por ejemplo mediante la aplicación de sistemas de bacterias o de presentación de fagos.

Los genes que expresan mutantes funcionales que muestran el perfil deseado de características se pueden seleccionar y someter a mutación adicional. Las etapas de mutación y de selección o de identificación sistemática se  
15 pueden repetir de forma repetitiva hasta que uno de los mutantes obtenidos muestre el perfil de características deseado.

Mediante el enfoque repetitivo, se puede realizar un número limitado de mutaciones, tal como por ejemplo de 1 a 5 mutaciones, y se puede evaluar su influencia sobre la característica de la enzima en cuestión y se pueden  
20 seleccionar por etapas mutantes mejorados adicionales. A continuación, dicho mutante seleccionado se puede someter a una mutación adicional básicamente de la misma manera. El número de mutantes individuales a evaluar se puede reducir significativamente de esta manera.

La presente divulgación proporciona información importante con relación a la estructura y la secuencia de la enzima/proteína en cuestión, en base a que debería ser posible generar enzimas/proteínas adicionales con el perfil  
25 de características modificadas deseado. En particular, se pueden definir los denominados puntos calientes, es decir regiones de la secuencia, que se pueden adecuar potencialmente para la mutación adicional con el fin de modificar o de generar una característica deseada de la enzima/proteína.

### 3.4 Constructos usados

Además, se desvelan constructos de expresión, que contienen, bajo el control genético de las secuencias reguladoras de ácidos nucleicos, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido o proteína de fusión;  
30 así como vectores que comprenden al menos uno de estos constructos de expresión.

"Unidad de expresión" se refiere a un ácido nucleico con actividad de expresión, que comprende un promotor tal como se define en el presente documento y, después de la asociación funcional con un ácido nucleico que se va a  
35 expresar o un gen, regula la expresión, es decir la transcripción y la traducción de este ácido nucleico o de este gen. En este contexto, por lo tanto, también se denomina "secuencia reguladora de ácidos nucleicos". Además del promotor, pueden estar presentes otros elementos de regulación, por ejemplo de potenciación.

"Casete de expresión" o "constructo de expresión" se refiere a una unidad de expresión, que se asocia funcionalmente con el ácido nucleico que se va a expresar o el gen que se va a expresar. En contraste con una  
40 unidad de expresión, un casete de expresión comprende de este modo no solamente secuencias de ácidos nucleicos que regulan la transcripción y la traducción, sino también las secuencias de ácidos nucleicos que se deberían expresar como proteína como resultado de la transcripción y de la traducción.

Los términos "expresión" o "sobrexpresión" describen la producción o aumento de la actividad intracelular de una o más enzimas en un microorganismo, que se codifican con el ADN correspondiente. Por esta razón, es posible, por  
45 ejemplo, insertar un gen en un organismo, reemplazar un gen existente por otro gen, aumentar el número de copias del gen o genes, usar un promotor fuerte o usar un gen que codifica una enzima correspondiente con una actividad elevada, y opcionalmente estas medidas se pueden combinar.

Preferentemente, dichos constructos comprenden un promotor corriente arriba en la posición 5' de la secuencia de codificación respectiva, y una secuencia de acabado corriente abajo en la posición 3', y además opcionalmente  
elementos de regulación habituales, en cada caso asociados funcionalmente con la secuencia de codificación.

Un "promotor", un "ácido nucleico con actividad promotora" o una "secuencia promotora" se refieren a un ácido  
50 nucleico que, asociado funcionalmente con un ácido nucleico que se va a transcribir, regula la transcripción de este ácido nucleico.

Asociación "funcional" u "operativa" se refiere, en este contexto, a que por ejemplo la colocación secuencial de uno de los ácidos nucleicos con actividad promotora y de una secuencia de ácidos nucleicos que se va a transcribir y además  
55 opcionalmente elementos de regulación, por ejemplo secuencias de ácidos nucleicos que permiten la transcripción de ácidos nucleicos, y por ejemplo a elemento de terminación, de un modo tal que cada uno de los

elementos de regulación puedan completar su función la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos. Esto no requiere necesariamente una asociación directa en el sentido químico. Las secuencias de control genético, tales como secuencias de potenciación, también pueden ejercer su función sobre la secuencia diana a partir de posiciones más alejadas o incluso a partir de otras moléculas de ADN. Se prefieren colocaciones en las que la secuencia de ácidos nucleicos que se va a transcribir se coloque por detrás (es decir, en el extremo 3') de la secuencia promotora, de modo que las consecuencias se unen covalentemente entre sí. La distancia entre la secuencia promotora y la secuencia de ácidos nucleicos que se va a expresar transgénicamente puede tener menos de 200 bp (pares de bases), o menos de 100 bp o menos de 50 bp.

Aparte de los promotores y los elementos de terminación, ejemplos de otros elementos de regulación que se pueden mencionar son secuencias de direccionamiento, elementos de potenciación, señales de poliadenilación, marcadores que se pueden seleccionar, señales de amplificación, orígenes de replicación y similares. Las secuencias reguladoras adecuadas se describen por ejemplo en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

Los constructos de ácidos nucleicos comprenden en particular secuencias seleccionadas entre las que se mencionan específicamente en el presente documento o derivados y homólogos de las mismas, así como las secuencias de ácidos nucleicos que pueden tener su origen en secuencias de aminoácidos que se mencionan específicamente en el presente documento que se asocian ventajosamente de forma cooperativa o funcional con una o más señales de regulación para el control, por ejemplo el aumento, de la expresión genética.

Además de estas secuencias reguladoras, la regulación natural de estas secuencias aún puede estar presente en frente de los genes estructurales reales y opcionalmente se pueden haber alterado genéticamente, de modo que la regulación natural se desconectara y la expresión de los genes se ha aumentado. Además, el constructo de ácido nucleico puede tener un diseño más sencillo, es decir sin ninguna señal de regulación adicional siendo insertada en frente de la secuencia de codificación y sin retirar el promotor natural con su regulación. En su lugar, la secuencia reguladora natural se silencia de modo que la regulación ya no se produce más y la expresión genética se ve aumentada.

Además, un constructo de ácido nucleico preferente contiene ventajosamente una o más de las secuencias de potenciación que se han mencionado anteriormente, asociadas funcionalmente con el promotor, que permiten la mayor expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. Además, secuencias ventajosas adicionales, tal como otros elementos de regulación o elementos de terminación, se pueden insertar en el extremo 3' de las secuencias de ADN. Una o más copias de los ácidos nucleicos se pueden contener en el constructo. El constructo también puede contener otros marcadores, tales como genes de resistencia a antibióticos o que complementan la auxotrofia, opcionalmente para la selección del constructo.

Ejemplos de secuencias de regulación adecuadas están contenidas en promotores tales como *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacI<sup>q</sup>*, *T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *rhaP* (*rhaP<sub>BAD</sub>*)*SP6-*, *lambda-P<sub>R-</sub>* o en el promotor *lambda-P<sub>L</sub>*, que encuentran aplicación ventajosamente en bacterias Gram-negativas. Otras secuencias de regulación ventajosas están contenidas por ejemplo en los promotores Gram-positivos *ace*, *amy* y *SPO2*, en los promotores de levadura o de hongos *ADC1*, *MFalfa*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH*. Además, se pueden usar promotores artificiales para la regulación.

Para la expresión, el constructo de ácidos nucleicos se inserta en un organismo huésped ventajosamente en un vector, por ejemplo un plásmido o un fago, que permite la expresión óptima de los genes en el huésped. Además de plásmidos y fagos, también se da a entender que los vectores se refieren a todos los otros vectores conocidos por la persona experta en la materia, por ejemplo virus, tales como SV40, CMV, baculovirus y adenovirus, transposones, elementos IS, fásmidos, cósmidos, y ADN lineal o circular. Estos vectores se pueden replicar de forma autónoma en el organismo huésped o se puede replicar cromosómicamente.

Los plásmidos adecuados están, por ejemplo en *E. coli*, *pLG338*, *pACYC184*, *pBR322*, *pUC18*, *pUC19*, *pKC30*, *pRep4*, *pHS1*, *pKK223-3*, *pDHE19,2*, *pHS2*, *pPLc236*, *pMBL24*, *pLG200*, *pUR290*, *pIN-III<sup>13</sup>-B1*, *λgt11* o *pBdCl*; en actinomicetos nocardioformes *pJAM2*; en *Streptomyces* *pIJ101*, *pIJ364*, *pIJ702* o *pIJ361*; en bacilos *pUB110*, *pC194* o *pBD214*; en *Corynebacterium* *pSA77* o *pAJ667*; en hongos *pALS1*, *pIL2* o *pBB116*; en levaduras *2alfaM*, *pAG-1*, *YEp6*, *YEp13* o *pEMBLYe23* o en plantas *pLGV23*, *pGHlac<sup>+</sup>*, *pBIN19*, *pAK2004* o *pDH51*. Los plásmidos que se han mencionado anteriormente representan una pequeña selección de los plásmidos posibles. Una persona experta en la materia conoce bien otros plásmidos y los encontrará por ejemplo en el libro Cloning Vectors (Eds. Pouwels P.H. y col. Elsevier, Amsterdam-Nueva York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Además, se mencionan plásmidos adecuados en la parte experimental.

El vector que contiene el constructo de ácido nucleico o el ácido nucleico se puede insertar ventajosamente en forma de un ADN lineal en los microorganismos y se puede integrar en el genoma del organismo huésped a través de recombinación heteróloga u homóloga. Este ADN lineal puede comprender un vector linealizado tal como plásmido o solamente el constructo de ácido nucleico o el ácido nucleico.

Para la expresión óptima de los genes heterólogos en organismos, es ventajoso alterar las secuencias de ácidos

nucleicos con el uso del codón específico usado en el organismo. El uso del codón se puede determinar fácilmente en base a las evaluaciones por ordenador de otros genes conocidos del organismo en cuestión.

5 La producción de un casete de expresión se basa en la fusión de un promotor adecuado con una secuencia de nucleótidos de codificación adecuada y una señal de elemento de terminación o una señal de poliadenilación. Para esto se usan técnicas habituales de recombinación y de clonación, tal como se describe por ejemplo en T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) así como en T.J. Silhavy, M.L. Berman y L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y en Ausubel, F.M. y *col.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience (1987).

10 El constructo de ácido nucleico recombinante o constructo genético se inserta ventajosamente en un vector específico de huésped para la expresión en un organismo huésped adecuado, para permitir la expresión óptima de los genes en de huésped. Una persona experta en la materia conoce bien los vectores y los encontrará por ejemplo en "Cloning Vectors" (Pouwels P.H. y *col.*, Publ. Elsevier, Amsterdam-Nueva York-Oxford, 1985).

### 3.5 Huéspedes que se pueden usar

15 Dependiendo del contexto, el término "microorganismo" se refiere al microorganismo de partida (tipo silvestre) o un microorganismo modificado genéticamente, o ambos.

La expresión "tipo silvestre" se refiere al microorganismo de de partida correspondiente, y no necesita necesariamente que corresponda con un organismo de origen natural.

20 Por medio de los vectores, se pueden producir microorganismos recombinantes, que se han transformado por ejemplo con al menos un vector y se pueden usar para la producción fermentativa de acuerdo con la invención.

25 De forma ventajosa, los constructos recombinantes que se han descrito anteriormente, se insertan y se expresan en un sistema huésped adecuado. Preferentemente, se usan procedimientos habituales de clonación y de transfección que son familiares para una persona experta en la materia, por ejemplo co-precipitación, fusión de protoplastos, electroporación, transfección retroviral y similares, para asegurar la expresión de los ácidos nucleicos indicados en los respectivos sistemas de expresión. Se describen sistemas adecuados por ejemplo en *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel y *col.*, Publ. Wiley Interscience, Nueva York 1997, o en Sambrook y *col.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

30 El organismo huésped o los organismos huésped contienen preferentemente al menos una de las secuencias de ácidos nucleicos, constructos de ácidos nucleicos o vectores descritos, que codifican una actividad enzimática de acuerdo con la definición anterior.

### 3.6 Producción enzimática de productos

35 Se proporciona una alícuota de al menos una enzima reductasa en forma disuelta o dispersa, por ejemplo inmovilizada, en una concentración apropiada de proteína para realizar las biotransformaciones, tal como por ejemplo en el intervalo de 10 a 300 o de 75 a 125 µg/ml. La reacción se realiza por lo general en medio de reacción tamponado que contiene un tampón adecuado, tal como por ejemplo tampón Tris-HCl (por ejemplo de 0,01 a 0,1 M) que contiene el sustrato en una concentración adecuada (de aproximadamente 0,1 a 100 mM) y el cofactor (NADH) (en un intervalo de concentración es apropiado, tal como de 0,1 a 100 mM). El cosolvente orgánico se puede añadir en una proporción adecuada de un 0,1 a un 80 % en volumen. Opcionalmente, el sustrato se puede disolver previamente en el co-solvente orgánico y a continuación se puede añadir al medio acuoso. La mezcla de reacción se puede agitar o sacudir con una intensidad adecuada, a una temperatura adecuada en el intervalo de 10 a 50 tal como de 25 a 30 °C durante un periodo de tiempo adecuado. Después del tiempo de reacción suficiente, tal como por ejemplo de 1 a 120 h o de 10 a 24 h, los productos se pueden extraer, por ejemplo con EtOAc. Un lector experto conoce bien otros agentes de extracción adecuados.

45 Para el reciclado del cofactor, una alícuota de la enzimas requerida, glucosa deshidrogenasa i.p., se puede añadir a la mezcla de reacción, en forma disuelta o dispersa, tal como por ejemplo inmovilizada y en una proporción adecuada (por ejemplo en un intervalo de 1 a 50 o de 5 a 15 o 10 U/ml) junto con el co-sustrato (tal como glucosa) también en una concentración apropiada (tal como de 0,1 a 100 mM) para dirigir la reacción de reciclado, que se acopla preferentemente a la reacción principal de reductasa.

### 50 3.7 Producción fermentativa de productos

La invención también se refiere a procedimientos para la producción fermentativa de compuestos de fórmula (I).

Los microorganismos recombinantes tal como se usan de acuerdo con la invención se pueden cultivar de forma continua o discontinua en el proceso discontinuo o en el lote de alimentación o en un procedimiento discontinuo de alimentación repetida. Una revisión de procedimientos de cultivo conocidos se encontrará en el libro de texto de

Chmiel (Bioprozesstechnik 1, Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

5 El medio de cultivo a va a usar debe satisfacer los requisitos de las cepas en particular de una forma apropiada. Se proporcionan descripciones de medios de cultivo para diversos microorganismos en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" de la Sociedad Americana de Bacteriología (Washington D. C., USA, 1981).

Estos medios que se pueden usar de acuerdo con la invención comprenden generalmente una o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas y/o elementos traza.

10 Las fuentes preferentes de carbón son azúcares, tales como mono-, di- o polisacáridos. Son fuentes de carbono muy buenas por ejemplo glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, sorbosa, ribulosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, almidón o celulosa. Además, se pueden añadir azúcares a los medios a través de compuestos complejos, tales como molasas, u otros productos secundarios a partir del refinado de azúcar. Además, puede ser ventajoso añadir mezclas de diversas fuentes de carbón. Otras fuentes de carbono posibles son aceites y grasas tales como  
15 aceite de semilla de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco, ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico o ácido linoleico, alcoholes tales como glicerol, metanol o etanol y ácidos orgánicos tales como ácido acético o ácido láctico.

20 Las fuentes de nitrógeno son habitualmente compuestos de nitrógeno orgánicos o inorgánicos o materiales que contienen estos compuestos. Ejemplos de fuentes de nitrógeno incluyen gas amoniaco o sales de amonio, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio o nitrato de amonio, nitratos, urea, aminoácidos o fuentes de nitrógeno complejas, tales como agua de macerado de maíz, harina de semilla de soja, proteína de semilla de soja, extracto de levadura, extracto de carne y otros. Las fuentes de nitrógeno se pueden usar separadamente o como una mezcla.

Los compuestos de sales inorgánicas que pueden estar presentes en los medios comprenden las sales cloruro, fosfato o sulfato de calcio, magnesio, sodio, cobalto, molibdeno, potasio, manganeso, cinc, cobre y hierro.

25 Los compuestos inorgánicos que contienen azufre, por ejemplo sulfatos, sulfitos, ditionitos, tetratonatos, tiosulfatos, sulfuros, y además compuestos orgánicos de azufre, tales como mercaptanos y tioles, se pueden usar como fuentes de azufre.

Como fuentes de fósforo se pueden usar ácido fosfórico, dihidrogenofosfato potásico o hidrogenofosfato dipotásico o las sales correspondientes que contiene sodio.

30 Se pueden añadir agentes quelantes al medio, para mantener los iones metálicos en solución. Los agentes quelantes especialmente adecuados comprenden dihidroxifenoles, tales como catecol o protocatechuato, o ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico.

35 Los medios de fermentación usados de acuerdo con la invención también pueden contener otros factores de crecimiento, tales como vitaminas o promotores del crecimiento, que incluyen por ejemplo biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato y piridoxina. A menudo, los factores de crecimiento y las sales provienen de componentes complejos de los medios, tales como extracto de levadura, molasas, papa de macerado de maíz y similares. Además, se pueden añadir precursores adecuados al medio de cultivo. La composición exacta de los compuestos en el medio es muy dependiente del experimento en particular y se debe decidir individualmente para cada caso específico. Se puede encontrar información sobre la optimización de los medios en el libro de texto  
40 "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Publ. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) p. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Además, se pueden obtener medios de crecimiento a partir de proveedores comerciales, tales como Standard 1 (Merck) o BHI (Infusión de cerebro-corazón, DIFCO), etc.

45 Todos los componentes del medio se esterilizan, por calentamiento (20 min a 200 kPa y 121 °C) o por filtración estéril. Los componentes se pueden esterilizar en conjunto, o si fuera necesario por separado. Todos los componentes del medio pueden estar presentes al comienzo del crecimiento, u opcionalmente se pueden añadir de forma continua o mediante alimentación discontinua.

50 La temperatura del cultivo normalmente está entre 15 °C y 45 °C, preferentemente de 25 °C a 40 °C y se puede mantener constante o puede variar durante el experimento. El valor del pH del medio debería estar en el intervalo de 5 a 8,5, preferentemente aproximadamente a 7,0. El valor del pH para el crecimiento se puede controlar durante el crecimiento mediante la adición de compuestos básicos tales como hidróxido sódico, hidróxido potásico, amoniaco o agua amoniacal o compuestos ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Se pueden usar agentes antiespumantes, por ejemplo ésteres poliglicólicos de ácido graso, para controlar la formación de espuma. Para mantener la estabilidad de los plásmidos, se pueden añadir sustancias adecuadas con acción selectiva al medio, por ejemplo antibióticos. Oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno, por ejemplo el aire ambiental, se  
55 alimentan en el cultivo con el fin de mantener las condiciones aeróbicas. La temperatura del cultivo normalmente es de 20 °C a 45 °C. El cultivo continúa hasta que se ha formado un máximo del producto deseado. Esto se consigue normalmente de 10 horas a 160 horas.

Las células se pueden alterar opcionalmente por ultrasonidos de alta frecuencia, por alta presión, por ejemplo en una celda de presión Francesa, por osmólisis, mediante la acción de detergentes, enzimas líticas o disolventes orgánicos, por medio de homogeneizadores o mediante una combinación de varios de los procedimientos indicados.

### 3.8 Inmovilización de enzimas

5 Si una enzima tal como se usa de acuerdo con la invención se inmoviliza, se une a un vehículo inerte. En la técnica se conocen materiales vehículo adecuados, por ejemplo, se desvelan en el documento EP-A-1149849, el documento EP-A-1 069 183 y el documento DE-OS 100193773 así como en las referencias de bibliografía citadas en esos documentos (todas las cuales se incluyen específicamente con respecto a materiales vehículo). Ejemplos de materiales vehículos adecuados son arcillas, minerales de arcilla tales como caolinita, tierra de diatomeas, perlita, 10 sílice, alúmina, carbonato sódico, carbonato de calcio, polvo de celulosa, materiales de intercambio aniónico, polímeros sintéticos, tales como poliestireno, resinas acrílicas, resinas de fenol formaldehído, poliuretanos y poliolefinas, tales como polietileno y polipropileno. Para preparar enzimas unidas a vehículos, los materiales vehículos se usan normalmente en forma de polvos finos, en los que se prefieren las formas porosas. El tamaño de partícula del material vehículo normalmente no supera los 5 mm, en particular 2 mm. En el caso de que al menos una enzima esté presente en una preparación de célula entera, dicha preparación de célula entera puede estar 15 presente en una forma libre o inmovilizada. Los materiales vehículo adecuados son por ejemplo alginato de Ca o Carragenano. Las enzimas, así como las células se pueden unir directamente mediante glutaraldehído. En la técnica se conoce una amplia gama de procedimientos de inmovilización (por ejemplo, J. Lalonde y A. Margolin "Immobilization of Enzymes" en K. Drauz y H. Waldmann, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis 2002, Vol. III, 991-20 1032, Wiley-VCH, Weinheim).

### 3.9 Aislamiento del producto

La metodología de la presente invención puede incluir adicionalmente una etapa de recuperación de compuestos tal como se producen de acuerdo con la invención. El término "recuperación" incluye extracción, cosecha, aislamiento o purificación del compuesto a partir del cultivo o medios de reacción. La recuperación del compuesto se puede 25 realizar de acuerdo con cualquier metodología de aislamiento o purificación convencional conocida en la técnica que incluye, pero no se limita, tratamiento con una resina convencional (por ejemplo, resina de intercambio aniónico o catiónico, resina de adsorción no iónica, etc.), tratamiento con un adsorbente convencional (por ejemplo, carbón vegetal activado, ácido silícico, gel de sílice, celulosa, alúmina, etc.), alteración del pH, extracción de disolventes (por ejemplo, con un disolvente convencional tal como un alcohol, acetato de etilo, hexano y similares), destilación, 30 diálisis, filtración, concentración, cristalización, recristalización, ajuste del pH, liofilización y similares.

### Parte Experimental

A menos que se indique de otro modo, los siguientes experimentos se ha realizado mediante el uso de equipo, procedimientos, agentes químicos, y agentes bioquímicos convencionales tal como se usan en ingeniería genética, 35 producción fermentativa de compuestos químicos mediante cultivo de microorganismos y en el análisis y el aislamiento de productos. Además, véase Sambrook *y col*, y Chmiel *y col* tal como se ha mencionado anteriormente en el presente documento.

### Materiales y procedimientos

#### a) Procedimientos Generales

40 Se desarrollaron placas de TLC sobre gel de sílice Merck 60 (F<sub>254</sub>) y los compuestos se visualizaron por pulverización con reactivo de Mo [(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O (100 g/l), Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (4 g/l) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 %)] o por UV (254 nm).

La conversión y el exceso enantiomérico se determinaron a través de análisis de GC o HPLC, respectivamente.

45 El análisis de GC se realizó en un cromatógrafo de gases Varian 3800 equipado con un detector FID usando H<sub>2</sub> como gas vehículo (100 kPa), usando una fase estacionaria aquiral [para la determinación de la conversión (Varian CP-1301, columna capilar de fase de cianopropil-fenilo al 6 %, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm), columna A] o una fase estacionaria quiral [para la determinación del exceso enantiomérico (Hydrodex-β-6TBDM, columna capilar de β-ciclodextrina modificada, 25 m x 0,25 mm), columna B]. la temperatura del inyector y del detector eran 180 y 250 °C, respectivamente, usando una velocidad de división de 20:1.

50 Los análisis de HPLC quiral se realizaron en un sistema Shimadzu equipado con una columna Chiralcel OD-H (columna C, 0,46 x 25 cm) o una columna Chiralcel OJ (columna D, 0,46 x 25 cm) para la determinación del exceso enantiomérico.

55 Los espectros de RMN se midieron en CDCl<sub>3</sub> usando un espectrómetro AMX de Bruker a 360 (<sup>1</sup>H) y 90 (<sup>13</sup>C) MHz. Los desplazamientos químicos se indican con respecto a TMS (□ 0,00) y las constantes de acoplamiento (J) se proporcionan en Hz. Los valores de rotación óptica ([α]<sub>D</sub><sup>20</sup>) se midieron en un polarímetro 341 de Perkin-Elmer a 589 nm (línea de Na) en una cubeta de 1 dm y se proporcionan en unidades de [(deg x ml)/(g x dm)].



Las concentraciones de proteína se determinaron usando el microensayo Bio-Rad con albúmina de suero bovino como patrón. SDS-PAGE se hizo en un aparato Mini Protein (Bio-Rad, Heidelberg, Alemania). Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie (Serva, Heidelberg, Alemania).

#### b) Materiales

5 NADH y NAD<sup>+</sup> se adquirieron en Biocatalytix/Codexis, la glucosa se obtuvo en Fluka y la glucosa deshidrogenasa en Jülich Chiral Solutions.

(*E*)-3-(4-*tert*-Butilfenil)-2-metilpropenal (**1a**), (*E*)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-metilpropenal (**2a**) y (*E*)- $\alpha$ -metilcinamaldehído (**3a**) se proporcionaron en BASF (Ludwigshafen).

10 (*E*)-3-(4-*tert*-Butilfenil)-2-metilpropenal (**1a**): <sup>1</sup>H (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 1,37 (s, 9H), 2,11 (s, 3H), 7,27 (s, 1 H) 7,48-7,53 (m, 4H), 9,59 (s, CHO); <sup>13</sup>C (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 10,96, 31,15, 34,89, 125,72, 130,07, 149,96, 195,70,

(*E*)-3-(1,3-Benzodioxol-5-il)-2-metilpropenal (**2a**): 1H (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 2,07 (s, 3H), 6,05 (s, 2H), 6,9-7,08 (m, 3H) 7,16 (s, 1H), 9,53 (s, 1H); <sup>13</sup>C (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 10,95, 101,62, 108,65, 109,62, 125,81, 129,44, 136,58, 148,09, 148,88, 149,75, 195,40.

15 (*E*)- $\alpha$ -Metilcinamaldehído (**3a**): <sup>1</sup>H (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 2,10 (s, 3H), 7,28 (s, 1H), 7,39-7,56 (m, 5H), 9,61 (s, CHO); <sup>13</sup>C (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 10,94, 128,72, 129,57, 130,03, 135,16, 138,39, 149,80, 195,55.

#### c) Clonación de genes

Se realizó manipulación de rutina de ADN, PCR y construcción de plásmidos recombinantes tal como describe en (Sambrook J y Russell DW (2001) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3<sup>a</sup> edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

20 El marco de lectura abierto de OPR1 de *Lycopersicon esculentum* se clonó en pET-21a y se sobre expresó como una proteína marcada con hexahistidina C-terminal en células BL21 de *E. coli* (C. Breithaupt, J. Strassner, U. Breitingner, R. Huber, P. Macheroux, A. Schaller, T. Clausen, Structure, 2001, 9, 419-429). La proteína recombinante sobreexpresada se purificó en una columna de afinidad de Ni-NTA (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. OPR3 de *Lycopersicon esculentum* e YqjM de *Bacillus subtilis* se sobre expresaron y purificaron tal como se ha indicado recientemente (C. Breithaupt, R. Kurzbauer, H. Lilie, A. Schaller, J. Strassner, R. Huber, P. Macheroux, T. Clausen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006, 103, 14337-14342; K. Kitzing, T. B. Fitzpatrick, C. Wilken, J. Sawa, G. P. Bourenkov, P. Macheroux, T. Clausen, J. Biol. Chem. 2005, 280, 27904-27913)

30 La clonación, purificación y caracterización de las iso-enzimas old yellow de levadura (OYE1 de *Saccharomyces carlsbergensis*, OYE2 y OYE3 de *Saccharomyces cerevisiae*) y reductasa de *Zymomonas mobilis* (NCR) se realizaron de acuerdo con la bibliografía (A. Müller, B. Hauer, B. Rosche, Biotechnol. Bioeng. 2007, 98, 22-29; K. Saito, D. J. Thiele, M. Davio, O. Lockridge, V. Massey, J. Biol. Chem. 1991, 266, 20720-20724; K. Stott, K. Saito, D. J. Thiele, V. Massey, J. Biol. Chem. 1993, 268, 6097-6106; Y. S. Niino, S. Chakraborty, B. J. Brown, V. Massey, J. Biol Chem. 1995, 270, 1983-1991).

35 NEM-reductasa (de *E. coli*), PETN-reductasa (de *Enterobacter cloacae*) y morfina-reductasa (de *Pseudomonas putida* M10) se proporcionaron en N. C. Bruce (Departamento de Biología, Universidad de York, York, Reino Unido) a) C. E. French, S. Nicklin, N. C. Bruce, J. Bacteriol. 1996, 178, 6623-6627; b) K. Miura, Y. Tomioka, H. Suzuki, M. Yonezawa, T. Hishinuma, M. Mizugaki, Biol. Pharm. Bull. 1997, 20, 110-112; c) C. E. French, N. C. Bruce, Biochem. J. 1994, 301, 97-103.

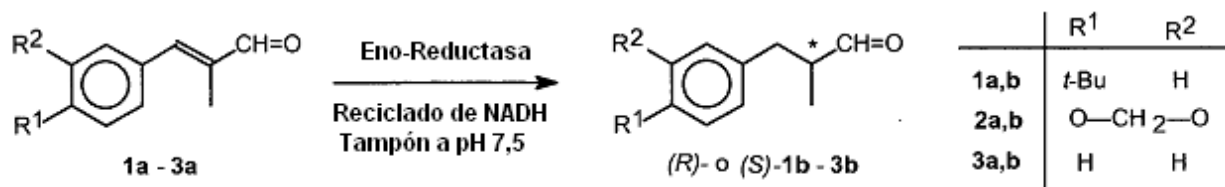
#### 40 Ejemplo 1: Síntesis de materiales de referencia a través de hidrogenación catalítica (no de acuerdo con la invención)

(*E*)-Alqueno (**1a-3a**, 0,5 mmol) se disolvió en THF (10 ml) y se hidrogeno en atmósfera de H<sub>2</sub> a presión atmosférica y a temperatura ambiente usando Pd/C (10 %, 5 mg) como catalizador. Después de agitar la mezcla durante una noche a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró a través de Celite y se concentró para producir los materiales racémicos de referencia (*rac*-**1b-3b**) a una conversión de un 99 %. Por lo tanto, se obtuvieron:

45 *rac*-3-(4-*tert*-Butilfenil)-2-metilpropanal (Lysmeral™, Lilial™, *rac*-**1b**): <sup>1</sup>H (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 1,11-1,12 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 1,33 (s, 9H), 2,59-2,63 (m, 2H), 3,05-3,09 (m, 1 H), 7,11-7,13 (d, 2H, *J* = 8,2), 7,32-7,35 (d, 2H, *J* = 8,2), 9,74-9,75 (d, CHO, *J* = 1,4); <sup>13</sup>C (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 13,30, 31,37, 34,39, 36,16, 48,02, 125,41, 128,67, 204,62.

50 *rac*-3-(1,3-Benzodioxol-5-il)-2-metilpropanal (Tropional™, Helional™, *rac*-**2b**): <sup>1</sup>H (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 1,09-1,11 (d, 3H, *J* = 6,8), 2,52-2,66 (m, 2H), 2,99-3,04 (m, 1H), 5,95 (s, 2H), 6,62-6,76 (m, 3H) 9,72 (s, CHO); <sup>13</sup>C (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 13,18, 36,40, 48,22, 100,91, 108,25, 109,30, 121,94, 132,50, 146,11, 147,73, 204,41.

*rac*-2-Metil-3-fenilpropanal (*rac*-**3b**): <sup>1</sup>H (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 1,10-1,12 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 2,59-2,73 (m, 2H), 3,09-3,14 (m, 1 H), 7,18-7,34 (m, 5H), 9,74-9,75 (d, CHO, *J* = 1,3 Hz); <sup>13</sup>C (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 13,21, 36,65, 48,04, 126,42, 128,53, 129,02, 138,83, 204,39.

**Ejemplo 2: Experimentos de biorreducción con diferentes Cinamaldehídos****Esquema 1.** Biorreducción asimétrica de los derivados de  $\alpha$ -metilcinamaldehído **1a - 3a**.**5 2.1 Experimentos de Preparación****(1) Procedimiento general para la enzimática biorreducción en condiciones convencionales**

Una alícuota de enzima (OPR1, OPR3, YqjM, OYE1-3, NCR, NEM-reductasa, concentración de proteínas en biotransformaciones: 75 -125  $\mu$ g/ml) se añadió a una solución de tampón Tris-HCl (0,8 ml, 50 mM, pH 7,5) que contenía el sustrato (10 mM) y el cofactor NADH (10 mM). La mezcla se agitó a 30 °C y 120 rpm. Después de 24 h, los productos se extrajeron con EtOAc (2 x 0,5 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and y se analizaron en un GC aquiral para determinar la conversión en un GC o HPLC quiral, respectivamente, para determinar el exceso enantiomérico.

**(2) Procedimiento general para reciclado de cofactor**

Una alícuota de enzima (véase anteriormente) se añadió a una solución de tampón Tris-HCl (0,8 ml, 50 mM, pH 7,5) que contenía el sustrato (10 mM) la forma oxidada del cofactor (NAD<sup>+</sup>, 100  $\mu$ M), el cosustrato (glucosa, 20 mM) y la enzima de reciclado (glucosa deshidrogenasa, 10 U). La mezcla se agitó a 30 °C y 120 rpm durante 24 h y se trató tal como se ha descrito anteriormente.

**(3) Procedimiento general para la biorreducción enzimática usando cosolventes orgánicos**

Un cosolvente orgánico (EtOH, *i*-Pr<sub>2</sub>O, *tert*-BuOMe, acetato de etilo y *n*-hexano) se usó en una relación de un 20 % (v:v). El sustrato (10 mM) se disolvió en el disolvente orgánico (200  $\mu$ l, para el estudio de la concentración de cosolvente en 50 - 250  $\mu$ l de *t*-BuOMe) y se añadió a una solución de tampón Tris-HCl (0,75 - 0,95 ml, 50 mM, pH 7,5) que contenía el cofactor NADH (10 mM) o el sistema de reciclado del cofactor (véase anteriormente) seguido de la adición de una alícuota de enzima (véase anteriormente). La mezcla se agitó a 30 °C y 120 rpm durante 24 h y se trató tal como se ha descrito anteriormente.

**25 2.2 Experimentos Analíticos****(1) Determinación de la configuración absoluta.**

La configuración absoluta de los productos **1b-3b** se determinó por comparación de su valor de rotación óptica ( $[\alpha]_D^{20}$ ) con datos de bibliografía. La configuración absoluta de **3b** se comprobó por duplicado independientemente por comparación del valor de rotación óptica de **3c** (2-metil-3-fenilpropan-1-ol), que se obtuvo por reducción química de **3b** (derivado a través de biorreducción de **3a** usando OYE2) usando NaBH<sub>4</sub>.

**Tabla 2.** Valores de rotación óptica de los productos.

Compuesto	$[\alpha]_D^{20}$	Condiciones <sup>a</sup>	E.e. [%]	Config.	Referencia
<b>1b<sup>d</sup></b>	+4,5	c = 1,8, CHCl <sub>3</sub>	83	( <i>S</i> )	este estudio
<b>1b</b>	-5,2	c = 1, CHCl <sub>3</sub>	95	( <i>R</i> )	(1)
<b>2b<sup>d</sup></b>	-2,9	c = 2,2, CHCl <sub>3</sub>	95	( <i>S</i> )	este estudio
<b>2b</b>	-2,8	c = 1,07, CHCl <sub>3</sub>	≥ 90	( <i>S</i> )	(2)
<b>3b<sup>d</sup></b>	-4,1	c = 0,5, MeOH	96	( <i>S</i> )	este estudio
<b>3b</b>	+7,0	c = 0,7, MeOH	76	( <i>R</i> )	(3)
<b>3b</b>	-4,42	c = 4, MeOH	94	( <i>S</i> )	(4)

(continuación)

Compuesto	$[\alpha]_D^{20}$	Condiciones <sup>a</sup>	E.e. [%]	Config.	Referencia
<b>3c</b> <sup>c</sup>	-11,3	c = 1,0, CHCl <sub>3</sub>	96	(S)	este estudio
<b>3c</b>	-14,0	c = 0,25, CHCl <sub>3</sub>	87	(S)	(5)

<sup>a</sup> Concentración [g/100 ml]; <sup>b</sup> obtenido usando OYE2; <sup>c</sup> 2-metil-3-fenil 1-propanol.

(1) D. Enders, H. Dyker, Liebigs Ann. Chem. 1990, 1107-1110.

(2) D. Enders, M. Backes, Tetrahedron: Asymmetry 2004, 15, 1813-1817.

(3) A. Baeza, C. Najera, J. M. Sansano, Eur. J. Org. Chem. 2007, 7, 1101-1112.

(4) M. V. Rangaishenvi, B. Singaram, H. C. Brown, J. Org. Chem. 1991, 56, 3286-3294.

(5) S. D. Bull, S. G. Davies, R. L. Nicholson, H. J. Sanganee, A. D. Smith, Org. Biomol. Chem. 2003, 1, 2886-2899.

## (2) Determinación de conversión y exceso enantiomérico.

La conversión y el exceso enantiomérico se determinaron a través de análisis de GC o HPLC, respectivamente.

**Tabla 3.** Determinación de la conversión a través del análisis de GC-aquiral.

Compuesto	Columna <sup>a</sup>	Condiciones <sup>b</sup>	$t_R$ [min]	
			<b>1a-3a</b>	<b>1b-3b</b>
<b>1</b>	A	E	8,23	5,45
<b>2</b>	A	E	8,99	5,78
<b>3</b> <sup>(f)</sup>	A	E	3,80	3,10

<sup>a</sup> Columna: A = Varian CP-1301, columna capilar de fase de cianopropil-fenilo al 6 %;

<sup>b</sup> condiciones: E = 100 kPa de H<sub>2</sub> a 180 °C, mantenido durante 11 min.

<sup>(f)</sup> A. Scrivanti, M. Bertoldini, V. Beghetto, U. Matteoli, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 543-548.

5

**Tabla 4.** Determinación del exceso enantiomérico a través de análisis de GC y HPLC quiral.

Compuesto	Columna <sup>a</sup>	Condiciones <sup>b</sup>	$t_R$ [min]	
			(R)	(S)
<b>1b</b>	C	G	29,45	29,73
<b>2b</b>	D	H	12,5	13,5
<b>3b</b>	B	F	11,8	12,7

<sup>a</sup> Columna: B = columna Chiralcel OJ (HPLC); C = Hydrodex-β-6TBDM, columna capilar de β-ciclodextrina modificada (GC); D = columna Chiralcel OD-H (HPLC); <sup>b</sup> condiciones: F = *n*-heptano/*i*-propanol a 99:1 (isocrático) a 18 °C, flujo 1 ml/min, ε = 190 nm, 205 nm, 215 nm; G = 100 kPa de H<sub>2</sub> a 130 °C, mantenido durante 0 min, velocidad de calentamiento de 1 °C/min a 165 °C, velocidad de calentamiento de 20 °C/min a 180 °C, mantenido durante 7 min; H = *n*-heptano/*i*-propanol a 98:2 (isocrático) a 18 °C, 0-15 min: flujo 1 ml/min, 15-20 min: flujo 1,5 ml/min, ε = 205 nm, 235 nm, 285 nm.

## 2.3 Resultados y Análisis

El producto de reducción de *p*-*terc*-butilcinamaldehído (**1b**) es el principio olfativo del lirio de los valles (Brenna, C. Fuganti, S. Serra, *Tetrahedron: Asymmetry* 2003, 14, 1-42; A. Scrivanti, M. Bertoldini, V. Beghetto, U. Matteoli, *Tetrahedron* 2008, 64, 543-548) y se comercializa con el nombre comercial Lilial™ o Lysmeral™, mientras que el *m,p*-metilendioxi aldehído **2b** es el principio activo de diversos perfumes y se comercializa como Helional™ o Tropional™ (D. Enders, M. Backes, *Tetrahedron: Asymmetry* 2004, 15, 1813-1817, C. Chapuis, D. Jacoby, *Appl. Catal. A: Gen.* 2001, 221, 93-117; D. Pybus, C. Sell, *The chemistry of fragrances*, RSC Paperbacks, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999).

La biorreducción de **1a** en condiciones convencionales en tampón acuoso puro a pH 7,5 resultó ser decepcionantemente lento usando una diversidad de eno-reductasas (no se muestran los datos). Sin embargo,

cuando la solubilidad del sustrato lipófilo se potenció mediante la adición de una pequeña cantidad de éter diisopropílico (5 %, v:v), las velocidades de reacción aumentaron notablemente (Tabla 5, entradas 1-7). Entre todas las enzimas, YqjM y la isoenzima OPR1 proporcionó (*R*)-**1b**, aunque con un exceso enantiomérico bajo (e.e.<sub>máx</sub> de un 21 %). Por el contrario, OPR3, NCR y las OYE 1-3 proporcionaron (*S*)-**1b** con estereoselectividades ligeramente mejoradas, pero aún eran insuficientes para fines de síntesis (e.e.<sub>máx</sub> de un 64 %). Dado que parecía que el cosolvente tenía una fuerte influencia sobre la velocidad de la reacción, los inventores anticiparon que también podría tener un impacto sobre la estereoselectividad de las eno-reductasas. Una cantidad mayor de éter diisopropílico (20 %, v:v) provocó una disminución de las velocidades de reacción, sin alterar las estereoselectividades de forma significativa, efectos similares (velocidades reducidas y estereoselectividad es ligeramente disminuidas) se observaron cuando *i*-Pr<sub>2</sub>O se reemplazó con acetato de etilo o con n-hexano (20 %, v:v, no se muestran los datos). Un cambio al cosolvente etanol miscible en agua (20 %, v:v) aumentó las velocidades (C<sub>máx</sub> de un 80 %) para OPR1, NCR y las OYE 1-3 que va acompañado con una disminución de las estereoselectividades (e.e.<sub>máx</sub> de un 51 %, entradas 8-12). YqjM y OPR3 eran ligeramente activas (no se muestran los datos). Por último, un cambio a *t*-butil metil éter proporcionó una solución ideal: Se obtuvieron estereoselectividad es excelentes con las OYE 1-3 con una modesta disminución de las velocidades de reacción (e.e.<sub>máx</sub> > 95 %, entradas 13-19).

Con el fin de ajustar el sistema, **1a** se redujo usando OYE3 en proporciones crecientes de *t*-butil metil éter. Tal como se puede deducir a partir de la figura 1, una clara correlación inversa entre la velocidad de reacción y la estereoselectividad (representada como conversión frente a e.e.) se observó con cantidades crecientes de cosolvente. En general, una fracción de un 20 % (v:v) de *t*-BuOMe parecía ser una buena concordancia entre una disminución de la actividad y un aumento de la estereoselectividad. En consecuencia, todos los estudios adicionales se realizaron con esta relación de cosolvente.

En condiciones optimizadas, se aceptó **2a** por todas las eno-reductasas (entradas 20-26). De acuerdo con las observaciones anteriores, YqjM y OPR1 mostraron una baja preferencia para formar (*R*)-**2b**. Se obtuvieron estereoselectividades (e.e.<sub>máx</sub> de un 96 %) y velocidades (hasta la conversión total) excelentes con NCR y las OYE 1-3 para (*S*)-**2b**. De modo interesante, los homólogos de OYE muy relacionados estructural y mecánicamente, *N*-etilmaleimida-(NEM)-reductasa, morfina reductasa y pentaeritrol tetranitrato-(PETN)-reductasa mostraron estereoselectividades o actividades insuficientes, solamente la NEM-reductasa proporcionó (*S*)-**1b** que (*S*)-**2b** con un e.e.<sub>máx</sub> de un 57 % y de un 18 %, respectivamente (la PETN-reductasa proporcionó (*R*)-**3b** con un e.e.<sub>máx</sub> de un 14 %).

**Tabla 5.** Conversión y exceso enantiomérico de los productos de biorreducción **1b-3b**.

Entrada	Sustrato	Enzima <sup>a</sup>	Condiciones	Conv. Del Producto [%]	E.e. [%]
1	<b>1a</b>	YqjM	tampón / <i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O (95:5)	3	13 ( <i>R</i> )
2	<b>1a</b>	OPR1	tampón / <i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O (95:5)	37	21 ( <i>R</i> )
3	<b>1a</b>	OPR3	tampón / <i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O (95:5)	4	22 ( <i>S</i> )
4	<b>1a</b>	NCR	tampón / <i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O (95:5)	66	59 ( <i>S</i> )
5	<b>1a</b>	OYE1	tampón / <i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O (95:5)	48	52 ( <i>S</i> )
6	<b>1a</b>	OYE2	tampón / <i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O (95:5)	75	64 ( <i>S</i> )
7	<b>1a</b>	OYE3	tampón / <i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O (95:5)	67	64 ( <i>S</i> )
8	<b>1a</b>	OPR1	tampón / EtOH (80:20)	62	21 ( <i>R</i> )
9	<b>1a</b>	NCR	tampón / EtOH (80:20)	68	40 ( <i>S</i> )
10	<b>1a</b>	OYE1	tampón / EtOH (80:20)	61	33 ( <i>S</i> )
11	<b>1a</b>	OYE2	tampón / EtOH (80:20)	80	51 ( <i>S</i> )
12	<b>1a</b>	OYE3	tampón / EtOH (80:20)	75	50 ( <i>S</i> )
13	<b>1a</b>	YqjM	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	0	n.d.
14	<b>1a</b>	OPR1	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	3	17 ( <i>R</i> )
15	<b>1a</b>	OPR3	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	0	n.d.
16	<b>1a</b>	NCR	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	26	83 ( <i>S</i> )
17	<b>1a</b>	OYE1	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	26	> 95 ( <i>S</i> )
18	<b>1a</b>	OYE2	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	26	> 95 ( <i>S</i> )
19	<b>1a</b>	OYE3	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	42	> 95 ( <i>S</i> )
20	<b>2a</b>	YqjM	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	10	13 ( <i>R</i> )

(continuación)

Entrada	Sustrato	Enzima <sup>a</sup>	Condiciones	Conv. Del Producto [%]	E.e. [%]
21	<b>2a</b>	OPR1	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	78	6 ( <i>R</i> )
22	<b>2a</b>	OPR3	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	8	34 ( <i>S</i> )
23	<b>2a</b>	NCR	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	86	88 ( <i>S</i> )
24	<b>2a</b>	OYE1	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	59	<b>95</b> ( <i>S</i> )
25	<b>2a</b>	OYE2	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	> 99	<b>97</b> ( <i>S</i> )
26	<b>2a</b>	OYE3	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	72	<b>96</b> ( <i>S</i> )
27	<b>3a</b>	YqjM	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	26	33 ( <i>R</i> )
28	<b>3a</b>	OPR1	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	> 99	53 ( <i>R</i> )
29	<b>3a</b>	OPR3	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	22	28 ( <i>S</i> )
30	<b>3a</b>	NCR	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	> 99	76 ( <i>S</i> )
31	<b>3a</b>	OYE1	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	> 99	<b>94</b> ( <i>S</i> )
32	<b>3a</b>	OYE2	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	> 99	<b>96</b> ( <i>S</i> )
33	<b>3a</b>	OYE3	tampón / <i>t</i> -BuOMe (80:20)	84	90 ( <i>S</i> )

<sup>a</sup> YqjM = homólogo de enzima Old Yellow de *Bacillus subtilis* (a) C. E. French, S. Nicklin, N. C. Bruce, J. Bacteriol. 1996, 178, 6623-6627; b) K. Miura, Y. Tomioka, H. Suzuki, M. Yonezawa, T. Hishinuma, M. Mizugaki, Biol. Pharm. Bull. 1997, 20, 110-112; c) C. E. French, N. C. Bruce, Biochem. J. 1994, 301, 97-103; OPR1 y OPR3 = isoenzimas de ácido 12-oxofitodienoico reductasa de *Lycopersicon esculentum* (tomate) (D. Enders, H. Dyker, Liebigs Ann. Chem. 1990, 1107-1110.); NCR = ciclohexanona reductasa dependiente de nicotinamida de *Zymomonas mobilis* (Para la biorreducción dio selectiva de  $\alpha$ -metilcinnamaldehído véase: A. Müller, B. Hauer, B. Rosche, Biotechnol. Bioeng. 2007, 98, 22-29.); OYE = Enzimas Old Yellow de *Saccharomyces carlsbergensis* (OYE1) y de *S. cerevisiae* (OYE2, OYE3) (D. Enders, M. Backes, Tetrahedron: Asymmetry 2004, 15, 1813-1817).

La configuración absoluta de los productos **1b** y **2b** se dedujo por comparación de los valores de la rotación óptica de **1b** y **2b** obtenidos usando OYE2 con datos de bibliografía (para detalles léase la parte experimental), que demostraron ser (*S*) para ambos sustratos. Sin embargo, la preferencia estereoquímica pronunciada de NCR y las OYE 1-3 para producir (*S*)-**1b** y (*S*)-**2b** está en conflicto con la preferencia (*R*) de estas enzimas en el homólogo cercano  $\alpha$ -metildihidrocinnamaldehído (**3a**), tal como se informa en B. Rosche y col. (A. Müller, B. Hauer, B. Rosche, Biotechnol. Bioeng. 2007, 98, 22-29)]. De acuerdo con este informe, la biorreducción de **3a** proporcionó (*R*)-**3b** en un 50 % y aproximadamente un e.e. de un 75 % usando NCR y las OYE 1-3, resp. Para clarificar esta discrepancia, los investigadores han vuelto a investigar el sustrato **3a** usando todas las eno-reductasas (entradas 27-33). De nuevo, la configuración absoluta de **3b** obtenida usando OYE2 se redujo por comparación de los valores de la rotación óptica con datos de bibliografía y demostró ser (*S*). Este resultado se comprobó por duplicado por reducción química del aldehído (*S*)-**3b** obtenido a través de biorreducción usando NaBH<sub>4</sub> para producir 2-metil-3-fenil-1-propanol (**3c**), que se demostró que tenía la configuración (*S*) en base a su rotación óptica. En conjunto, el resultado estereoquímico de la reducción de **3a** se adaptó muy bien a los resultados anteriores, tal como se podía esperar dado que los sustratos **1a-3a** representan una serie estructuralmente homóloga: aunque YqjM y OPR1 proporcionaron (*R*)-**3b** con estereoselectividades discretas (e.e.<sub>máx</sub> de un 53 % usando OPR1), OPR3, NCR y OYE1-3 proporcionaron predominantemente (*S*)-**3b** en un e.e. de hasta un 96 %. En vista de estos resultados, la asignación estereoquímica de **3b** - se informó que era (*R*) (Para la biorreducción estereoselectiva del  $\alpha$ -metilcinnamaldehído véase: A. Müller, B. Hauer, B. Rosche, Biotechnol. Bioeng. 2007, 98, 22-29) - se tuvo que corregir para que fuera (*S*). En consecuencia, las consideraciones de replicación para explicar un 'cambio' estereoquímicos de OYE1-3 y NCR entre 2-metilpent-2-enal y **3a** se invalidan.

## 2.4 Conclusiones

Una síntesis quicio-enzimática conveniente para la fragancia de los aldehídos Lilial™ (**1b**) y Helional™ (**2b**) se desarrolló a través de biorreducción asimétrica de los derivados de  $\alpha$ -metildihidrocinnamaldehído **1a** y **2a** catalizados por eno-reductasas clonadas y sobre expresadas. Aunque se formaron (*R*)-**1b** y (*R*)-**2b** con e.e. discretas usando YqjM y OPR1, NCR y las OYE 1-3 proporcionaron las antípodas (*S*) en un e.e. de hasta un 96 %, cuando las reacciones se realizaron en un sistema bifásico acuoso-orgánico que contenía *t*-butil metil éter (20 %, v:v). El resultado estereoquímicos de la reducción del  $\alpha$ -metilcinnamaldehído **3a** usando NCR y OYE1-3 - que

anteriormente se informó que eran (*R*) (Para la biorreducción estereoselectiva del  $\alpha$ -metilcinamaldehído véase: A. Müller, B. Hauer, B. Rosche, *Biotechnol. Bioeng.* 2007, 98, 22-29) – se corrigió de forma inequívoca para que fuera (*S*).

**Tabla 6:** Lista de SEC ID N<sup>º</sup>s

Designación	Organismo	tipo	SEC ID N <sup>º</sup> :
OYE1		AS	1
OYE2		AS	2
OYE2		AS	3
OPR1		AS	4
OPR3		AS	5
YqiM		AS	6
NCR		AS	7
AS Secuencia de aminoácidos NS Secuencia de ácidos nucleicos			

5 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> BASF SE

10 <120> Procedimiento de producción de aldehídos catalizada enzimáticamente

<130> M/51008-PCT

<160> 7

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 400

<212> PRT

20 <213> *Saccharomyces carlsbergensis*

<400> 1

ES 2 487 218 T3

Met Ser 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 Leu His Pro Gly Asn Ile  
 35 40 45

Pro Asn Arg Asp Trp Ala Val Glu Tyr Tyr Thr Gln Arg Ala Gln Arg  
 50 55 60

Pro Gly Thr Met Ile Ile Thr Glu Gly Ala Phe Ile Ser Pro Gln Ala  
 65 70 75 80

Gly Gly Tyr Asp Asn Ala Pro Gly Val Trp Ser Glu Glu Gln Met Val  
 85 90 95

Glu Trp Thr Lys Ile Phe Asn Ala Ile His Glu Lys Lys Ser Phe Val  
 100 105 110

Trp Val Gln Leu Trp Val Leu Gly Trp Ala Ala Phe Pro Asp Asn Leu  
 115 120 125

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

Asp Ala Glu Gln Glu Ala Lys Ala Lys Lys Ala Asn Asn Pro Gln His  
 145 150 155 160

Ser Leu Thr Lys Asp Glu Ile Lys Gln Tyr Ile 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

ES 2 487 218 T3

		195					200					205			
Thr	Arg	Thr	Asp	Glu	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ile	Glu	Asn	Arg	Ala	Arg	Phe
	210					215					220				
Thr	Leu	Glu	Val	Val	Asp	Ala	Leu	Val	Glu	Ala	Ile	Gly	His	Glu	Lys
225					230					235					240
Val	Gly	Leu	Arg	Leu	Ser	Pro	Tyr	Gly	Val	Phe	Asn	Ser	Met	Ser	Gly
				245					250					255	
Gly	Ala	Glu	Thr	Gly	Ile	Val	Ala	Gln	Tyr	Ala	Tyr	Val	Ala	Gly	Glu
			260					265					270		
Leu	Glu	Lys	Arg	Ala	Lys	Ala	Gly	Lys	Arg	Leu	Ala	Phe	Val	His	Leu
		275					280					285			
Val	Glu	Pro	Arg	Val	Thr	Asn	Pro	Phe	Leu	Thr	Glu	Gly	Glu	Gly	Glu
	290					295					300				
Tyr	Glu	Gly	Gly	Ser	Asn	Asp	Phe	Val	Tyr	Ser	Ile	Trp	Lys	Gly	Pro
305					310					315					320
Val	Ile	Arg	Ala	Gly	Asn	Phe	Ala	Leu	His	Pro	Glu	Val	Val	Arg	Glu
				325					330					335	
Glu	Val	Lys	Asp	Lys	Arg	Thr	Leu	Ile	Gly	Tyr	Gly	Arg	Phe	Phe	Ile
			340					345					350		
Ser	Asn	Pro	Asp	Leu	Val	Asp	Arg	Leu	Glu	Lys	Gly	Leu	Pro	Leu	Asn
		355					360					365			
Lys	Tyr	Asp	Arg	Asp	Thr	Phe	Tyr	Gln	Met	Ser	Ala	His	Gly	Tyr	Ile
	370					375					380				
Asp	Tyr	Pro	Thr	Tyr	Glu	Glu	Ala	Leu	Lys	Leu	Gly	Trp	Asp	Lys	Lys
385					390					395					400

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

5

<400> 2



ES 2 487 218 T3

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

ES 2 487 218 T3

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

ES 2 487 218 T3

Ile Ile Arg Ala Gly Asn Phe Ala Leu His Pro Glu Val Val Arg Glu  
 325 330 335  
 Glu Val Lys Asp Pro Arg Thr Leu Ile Gly Tyr Gly Arg Phe Phe Ile  
 340 345 350  
 Ser Asn Pro Asp Leu Val Asp Arg Leu Glu Lys Gly Leu Pro Leu Asn  
 355 360 365  
 Lys Tyr Asp Arg Asp Thr Phe Tyr Lys Met Ser Ala Glu Gly Tyr Ile  
 370 375 380  
 Asp Tyr Pro Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Lys Leu Gly Trp Asp Lys Asn  
 385 390 395 400

<210> 3  
 <211> 400  
 <212> PRT  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

5

<400> 3

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

10

ES 2 487 218 T3

Ser Leu Thr Lys Asp 165 Asp Ile Lys Gln Tyr 170 Ile Lys Asp Tyr Ile His 175  
 Ala Ala Lys Asn 180 Ser Ile Ala Ala Gly 185 Ala Asp Gly Val Glu 190 Ile His  
 Ser Ala Asn 195 Gly Tyr Leu Leu Asn 200 Gln Phe Leu Asp Pro 205 His Ser Asn  
 Lys Arg Thr Asp Glu Tyr Gly 215 Gly Thr Ile Glu Asn 220 Arg Ala Arg Phe  
 Thr 225 Leu Glu Val Val Asp 230 Ala Leu Ile Glu Thr 235 Ile Gly Pro Glu Arg 240  
 Val Gly Leu Arg Leu 245 Ser Pro Tyr Gly Thr 250 Phe Asn Ser Met Ser Gly 255  
 Gly Ala Glu Pro 260 Gly Ile Ile Ala Gln 265 Tyr Ser Tyr Val Leu Gly Glu  
 Leu Glu Lys 275 Arg Ala Lys Ala Gly 280 Lys Arg Leu Ala Phe 285 Val His Leu  
 Val Glu 290 Pro Arg Val Thr Asp 295 Pro Ser Leu Val Glu 300 Gly Glu Gly Glu  
 Tyr 305 Ser Glu Gly Thr Asn 310 Asp Phe Ala Tyr Ser 315 Ile Trp Lys Gly Pro 320  
 Ile Ile Arg Ala Gly 325 Asn Tyr Ala Leu His 330 Pro Glu Val Val Arg Glu 335  
 Gln Val Lys Asp 340 Pro Arg Thr Leu Ile 345 Gly Tyr Gly Arg Phe 350 Phe Ile  
 Ser Asn Pro 355 Asp Leu Val Tyr Arg 360 Leu Glu Glu Gly Leu Pro Leu Asn 365  
 Lys Tyr 370 Asp Arg Ser Thr Phe 375 Tyr Thr Met Ser Ala 380 Glu Gly Tyr Thr  
 Asp 385 Tyr Pro Thr Tyr Glu 390 Glu Ala Val Asp Leu 395 Gly Trp Asn Lys Asn 400

<210> 4  
 <211> 376  
 <212> PRT  
 <213> *Solanum lycopersicon*

<400> 4

ES 2 487 218 T3

Met Glu Asn Lys Val Val Glu Glu Lys Gln Val Asp Lys Ile Pro Leu  
1 5 10 15

Met Ser Pro Cys Lys Met Gly Lys Phe Glu Leu Cys His Arg Val Val  
20 25 30

Leu Ala Pro Leu Thr Arg Gln Arg Ser Tyr Gly Tyr Ile Pro Gln Pro  
35 40 45

His Ala Ile Leu His Tyr Ser Gln Arg Ser Thr Asn Gly Gly Leu Leu  
50 55 60

Ile Gly Glu Ala Thr Val Ile Ser Glu Thr Gly Ile Gly Tyr Lys Asp  
65 70 75 80

Val Pro Gly Ile Trp Thr Lys Glu Gln Val Glu Ala Trp Lys Pro Ile  
85 90 95

Val Asp Ala Val His Ala Lys Gly Gly Ile Phe Phe Cys Gln Ile Trp  
100 105 110

His Val Gly Arg Val Ser Asn Lys Asp Phe Gln Pro Asn Gly Glu Asp  
115 120 125

Pro Ile Ser Cys Thr Asp Arg Gly Leu Thr Pro Gln Ile Arg Ser Asn  
130 135 140

Gly Ile Asp Ile Ala His Phe Thr Arg Pro Arg Arg Leu Thr Thr Asp  
145 150 155 160

Glu Ile Pro Gln Ile Val Asn Glu Phe Arg Val Ala Ala Arg Asn Ala  
165 170 175

Ile Glu Ala Gly Phe Asp Gly Val Glu Ile His Gly Ala His Gly Tyr  
180 185 190

Leu Ile Asp Gln Phe Met Lys Asp Gln Val Asn Asp Arg Ser Asp Lys  
195 200 205

Tyr Gly Gly Ser Leu Glu Asn Arg Cys Arg Phe Ala Leu Glu Ile Val  
210 215 220

Glu Ala Val Ala Asn Glu Ile Gly Ser Asp Arg Val Gly Ile Arg Ile  
225 230 235 240

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

Leu Gly Leu Tyr Met Val Glu Ser Leu Asn Lys Tyr Asp Leu Ala Tyr  
260 265 270

ES 2 487 218 T3

Cys His Val Val Glu Pro Arg Met Lys Thr Ala Trp Glu Lys Ile Glu  
275 280 285

Cys Thr Glu Ser Leu Val Pro Met Arg Lys Ala Tyr Lys Gly Thr Phe  
290 295 300

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

Glu Asp Arg Ala Asp Leu Val Ala Tyr Gly Arg Leu Phe Ile Ser Asn  
325 330 335

Pro Asp Leu Pro Lys Arg Phe Glu Leu Asn Ala Pro Leu Asn Lys Tyr  
340 345 350

Asn Arg Asp Thr Phe Tyr Thr Ser Asp Pro Ile Val Gly Tyr Thr Asp  
355 360 365

Tyr Pro Phe Leu Glu Thr Met Thr  
370 375

<210> 5

<211> 396

<212> PRT

<213> *Solanum lycopersicon*

<400> 5

5

ES 2 487 218 T3

Met Ala Ser Ser Ala Gln Asp Gly Asn Asn Pro Leu Phe Ser Pro Tyr  
1 5 10 15

Lys Met Gly Lys Phe Asn Leu Ser His Arg Val Val Leu Ala Pro Met  
20 25 30

Thr Arg Cys Arg Ala Leu Asn Asn Ile Pro Gln Ala Ala Leu Gly Glu  
35 40 45

Tyr Tyr Glu Gln Arg Ala Thr Ala Gly Gly Phe Leu Ile Thr Glu Gly  
50 55 60

Thr Met Ile Ser Pro Thr Ser Ala Gly Phe Pro His Val Pro Gly Ile  
65 70 75 80

Phe Thr Lys Glu Gln Val Arg Glu Trp Lys Lys Ile Val Asp Val Val  
85 90 95

His Ala Lys Gly Ala Val Ile Phe Cys Gln Leu Trp His Val Gly Arg  
100 105 110

Ala Ser His Glu Val Tyr Gln Pro Ala Gly Ala Ala Pro Ile Ser Ser  
115 120 125

Thr Glu Lys Pro Ile Ser Asn Arg Trp Arg Ile Leu Met Pro Asp Gly

ES 2 487 218 T3

130						135						140			
Thr 145	His	Gly	Ile	Tyr	Pro 150	Lys	Pro	Arg	Ala	Ile 155	Gly	Thr	Tyr	Glu	Ile 160
Ser	Gln	Val	Val	Glu 165	Asp	Tyr	Arg	Arg	Ser 170	Ala	Leu	Asn	Ala	Ile 175	Glu
Ala	Gly	Phe	Asp 180	Gly	Ile	Glu	Ile	His 185	Gly	Ala	His	Gly	Tyr 190	Leu	Ile
Asp	Gln	Phe 195	Leu	Lys	Asp	Gly	Ile 200	Asn	Asp	Arg	Thr	Asp 205	Glu	Tyr	Gly
Gly	Ser 210	Leu	Ala	Asn	Arg	Cys 215	Lys	Phe	Ile	Thr	Gln 220	Val	Val	Gln	Ala
Val 225	Val	Ser	Ala	Ile	Gly 230	Ala	Asp	Arg	Val	Gly 235	Val	Arg	Val	Ser	Pro 240
Ala	Ile	Asp	His	Leu 245	Asp	Ala	Met	Asp	Ser 250	Asn	Pro	Leu	Ser	Leu 255	Gly
Leu	Ala	Val	Val 260	Glu	Arg	Leu	Asn	Lys 265	Ile	Gln	Leu	His	Ser 270	Gly	Ser
Lys	Leu	Ala 275	Tyr	Leu	His	Val	Thr 280	Gln	Pro	Arg	Tyr	Val 285	Ala	Tyr	Gly
Gln	Thr 290	Glu	Ala	Gly	Arg	Leu 295	Gly	Ser	Glu	Glu	Glu 300	Glu	Ala	Arg	Leu
Met 305	Arg	Thr	Leu	Arg	Asn 310	Ala	Tyr	Gln	Gly	Thr 315	Phe	Ile	Cys	Ser	Gly 320
Gly	Tyr	Thr	Arg	Glu 325	Leu	Gly	Ile	Glu	Ala 330	Val	Ala	Gln	Gly	Asp 335	Ala
Asp	Leu	Val	Ser 340	Tyr	Gly	Arg	Leu	Phe 345	Ile	Ser	Asn	Pro	Asp 350	Leu	Val
Met	Arg	Ile 355	Lys	Leu	Asn	Ala	Pro 360	Leu	Asn	Lys	Tyr	Asn 365	Arg	Lys	Thr
Phe	Tyr 370	Thr	Gln	Asp	Pro	Val 375	Val	Gly	Tyr	Thr	Asp 380	Tyr	Pro	Phe	Leu
Gln 385	Gly	Asn	Gly	Ser	Asn 390	Gly	Pro	Leu	Ser	Arg 395	Leu				



<211> 338  
<212> PRT  
<213> *Bacillus subtilis* NamA

5 <400> 6

ES 2 487 218 T3

Met Ala Arg Lys Leu Phe Thr Pro Ile Thr Ile Lys Asp Met Thr Leu  
1 5 10

Lys Asn Arg Ile Val Met Ser Pro Met Cys Met Tyr Ser Ser His Glu  
20 25 30

Lys Asp Gly Lys Leu Thr Pro Phe His Met Ala His Tyr Ile Ser Arg  
35 40 45

Ala Ile Gly Gln Val Gly Leu Ile Ile Val Glu Ala Ser Ala Val Asn  
50 55 60

Pro Gln Gly Arg Ile Thr Asp Gln Asp Leu Gly Ile Trp Ser Asp Glu  
65 70 75 80

His Ile Glu Gly Phe Ala Lys Leu Thr Glu Gln Val Lys Glu Gln Gly  
85 90 95

Ser Lys Ile Gly Ile Gln Leu Ala His Ala Gly Arg Lys Ala Glu Leu  
100 105 110

Glu Gly Asp Ile Phe Ala Pro Ser Ala Ile Ala Phe Asp Glu Gln Ser  
115 120 125

Ala Thr Pro Val Glu Met Ser Ala Glu Lys Val Lys Glu Thr Val Gln  
130 135 140

Glu Phe Lys Gln Ala Ala Ala Arg Ala Lys Glu Ala Gly Phe Asp Val  
145 150 155 160

Ile Glu Ile His Ala Ala His Gly Tyr Leu Ile His Glu Phe Leu Ser  
165 170 175

Pro Leu Ser Asn His Arg Thr Asp Glu Tyr Gly Gly Ser Pro Glu Asn  
180 185 190

Arg Tyr Arg Phe Leu Arg Glu Ile Ile Asp Glu Val Lys Gln Val Trp  
195 200 205

Asp Gly Pro Leu Phe Val Arg Val Ser Ala Ser Asp Tyr Thr Asp Lys  
210 215 220

Gly Leu Asp Ile Ala Asp His Ile Gly Phe Ala Lys Trp Met Lys Glu  
225 230 235 240

Gln Gly Val Asp Leu Ile Asp Cys Ser Ser Gly Ala Leu Val His Ala  
245 250 255

Asp Ile Asn Val Phe Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Ala Glu Lys Ile  
 260 265 270  
 Arg Glu Gln Ala Asp Met Ala Thr Gly Ala Val Gly Met Ile Thr Asp  
 275 280 285  
 Gly Ser Met Ala Glu Glu Ile Leu Gln Asn Gly Arg Ala Asp Leu Ile  
 290 295 300  
 Phe Ile Gly Arg Glu Leu Leu Arg Asp Pro Phe Phe Ala Arg Thr Ala  
 305 310 315 320  
 Ala Lys Gln Leu Asn Thr Glu Ile Pro Ala Pro Val Gln Tyr Glu Arg  
 325 330 335

Gly Trp

<210> 7  
 <211> 358  
 <212> PRT  
 <213> *zymomonas mobilis*

5

<400> 7

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

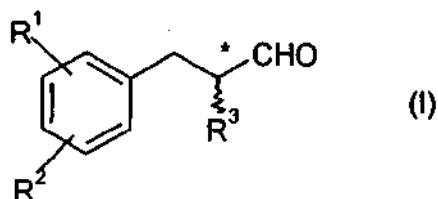
10

ES 2 487 218 T3

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

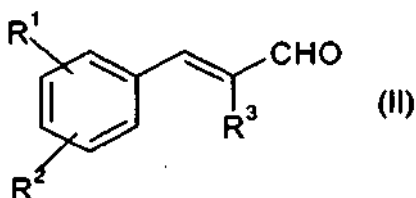
## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento catalizado enzimáticamente de producción de un compuesto aldehído de fórmula general I



5 en la que  
 R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> independientemente el uno del otro representan alquilo opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alqueniilo, -H, -OH, -SH, -halógeno, -NH<sub>2</sub>, o -NO<sub>2</sub>; o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> representan conjuntamente un grupo de fórmula -O-R<sup>4</sup>-O-, en la que R<sup>4</sup> representa un grupo alquilenilo o alqueniilo opcionalmente sustituido; y  
 10 R<sup>3</sup> representa alquilo o alcoxi;  
 cuyo procedimiento comprende:

a) reducir enzimáticamente un compuesto de fórmula II



15 en la que  
 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son tal como se han definido anteriormente,  
 en un medio acuoso de reacción que comprende una proporción de un 5 a un 40 % en volumen como un cosolvente al menos un compuesto de éter no simétrico de fórmula III



20 en la que  
 uno de los restos R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es un grupo alquilo C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub> ramificado, y el otro es un grupo alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> y además que contiene al menos una enzima reductasa y al menos un cofactor;  
 en el que dicha reductasa se selecciona entre el grupo que consiste en

- 25 i) OYE1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N<sup>o</sup>: 1, o una secuencia idéntica en al menos un 60 % con dicha SEC ID N<sup>o</sup>: 1 y que es capaz de hidrogenar un compuesto de fórmula II en la posición C2/C3;  
 ii) OYE2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N<sup>o</sup>: 2, o una secuencia idéntica en al menos un 60 % con dicha SEC ID N<sup>o</sup>: 2 y que es capaz de hidrogenar un compuesto de fórmula II en la posición C2/C3;  
 30 iii) OYE3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N<sup>o</sup>: 3, o una secuencia idéntica en al menos un 60 % con dicha SEC ID N<sup>o</sup>: 3 y que es capaz de hidrogenar un compuesto de fórmula II en la posición C2/C3;

y

b) opcionalmente aislar dicho compuesto de fórmula I en forma de un estereoisómero básicamente puro o como una mezcla de estereoisómeros.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho cosolvente es un t-butil alquil éter.

35 3. El procedimiento de una de las reivindicaciones precedentes, en el que la reacción se realiza en presencia de NADH o NADPH como cofactor.

4. El procedimiento de una de las reivindicaciones precedentes, en el que la reacción de reducción se acopla a una reacción de reciclado de cofactor.

40 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el cofactor NAD oxidado se recicla por acoplamiento a la oxidación de glucosa catalizada por la glucosa deshidrogenasa.

6. El procedimiento de una de las reivindicaciones precedentes, en el que las enzimas implicadas están presentes en el medio de reacción en forma disuelta, dispersa o inmovilizada.
7. El procedimiento de una de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio de reacción se tampona a un pH en el intervalo de 6,5 a 8,5.
- 5 8. El procedimiento de una de las reivindicaciones precedentes, en el que la temperatura de reacción está en el intervalo de 10 a 50 °C.

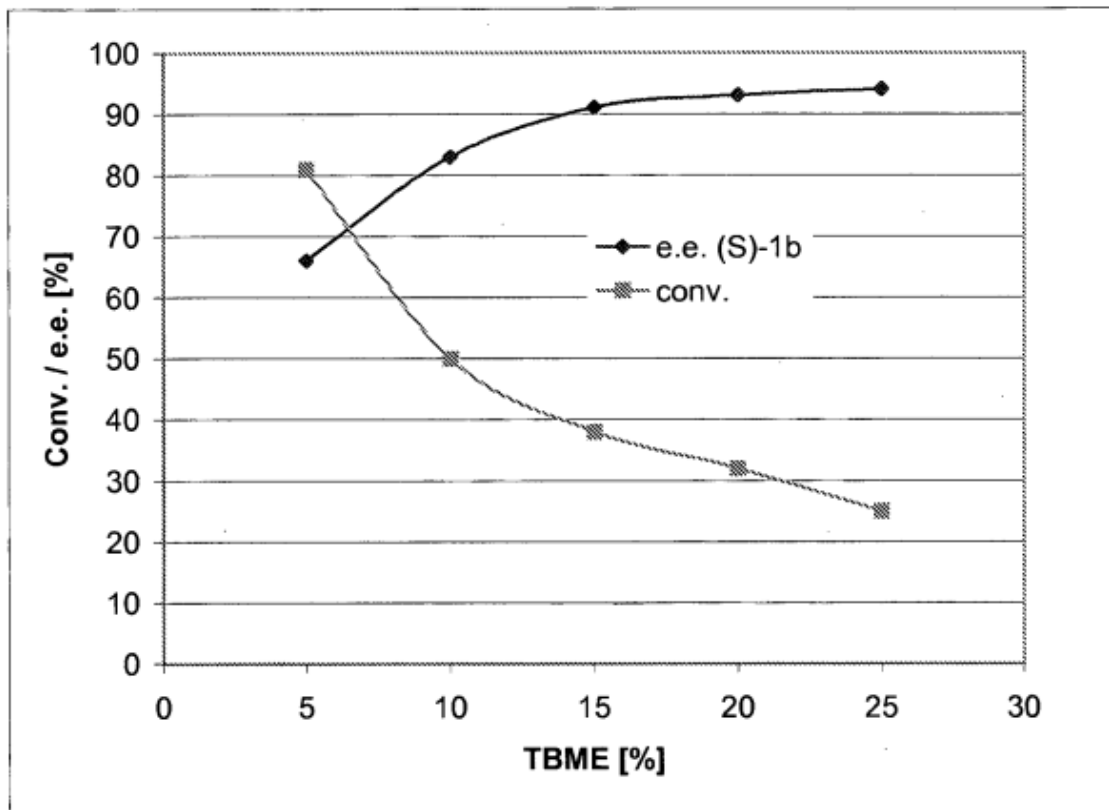


Fig. 1