

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
24 décembre 2020 (24.12.2020)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2020/254744 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12P 11/00 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)
C12P 17/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2020/051013

(22) Date de dépôt international :
12 juin 2020 (12.06.2020)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
FR1906488 17 juin 2019 (17.06.2019) FR
FR2002305 09 mars 2020 (09.03.2020) FR

(71) Déposants : **ARKEMA FRANCE** [FR/FR] ; 420 rue d'Estienne d'Orves, 92700 COLOMBES (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR] ; 3 rue Michel-Ange, 75016 PARIS (FR). **UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE** [FR/FR] ; 58 boulevard Charles Livon, 13284 MARSEILLE CEDEX 7 (FR).

(72) Inventeurs : **FREMY, Georges** ; ARKEMA FRANCE - GRL, RD 817, 64170 LACQ (FR). **BRASSELET, Hugo** ; ARKEMA FRANCE - GRL, RD 817, 64170 LACQ (FR). **ALPHAND, Véronique** ; 3 rue d'Algésiras, 13010 MARSEILLE (FR). **DUQUESNE, Katia** ; 5 rue des Clarines, 13127 VITROLLES (FR).

(74) Mandataire : **STEFENEL, Alexandra** ; 420 rue d'Estienne d'Orves, 92700 COLOMBES (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM,

(54) Title: SELECTIVE PROCESS FOR PREPARING SULFOXIDES BY ENZYMATIC CATALYSIS

(54) Titre : PROCÉDÉ SÉLECTIF DE PRÉPARATION DE SULFOXYDES PAR CATALYSE ENZYMATIQUE

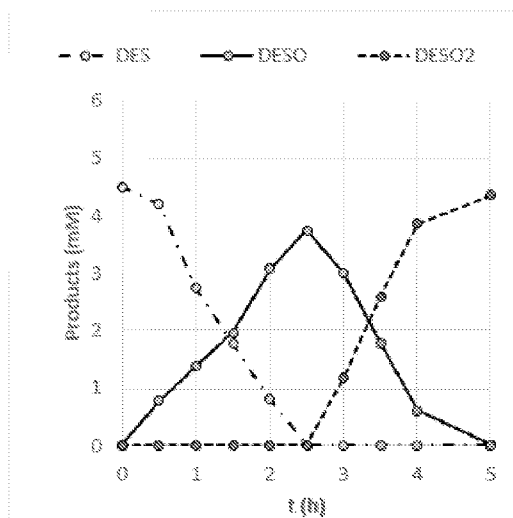


FIGURE 1

(57) Abstract: The present invention relates to a selective process for preparing sulfoxides from sulfides by enzymatic catalysis, as well as to a composition comprising a symmetrical sulfide, wherein an oxidoreductase enzyme catalyzes the oxidation of said symmetrical sulfide to a symmetrical sulfoxide; optionally at least one cofactor C of said enzyme E; and an oxidant allowing in particular the implementation of said process.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé sélectif de préparation de sulfoxydes à partir de sulfures par catalyse enzymatique, ainsi qu'une composition comprenant un sulfure symétrique, une enzyme oxydoréductase catalysant l'oxydation dudit sulfure symétrique en sulfoxyde symétrique; éventuellement au moins un cofacteur C de ladite enzyme E; et un oxydant, permettant notamment de mettre en œuvre ledit procédé.

[Suite sur la page suivante]



WO 2020/254744 A1

KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

DESCRIPTION

PROCÉDE SELECTIF DE PREPARATION DE SULFOXYDES PAR CATALYSE ENZYMATIQUE

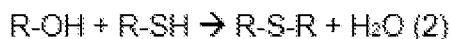
La présente invention concerne un procédé sélectif de préparation de sulfoxydes organiques à partir de sulfures organiques par catalyse enzymatique, ainsi qu'une composition permettant notamment la mise en œuvre de ce procédé, et ses utilisations.

Les mercaptans présentent un grand intérêt industriel et sont aujourd'hui très largement utilisés par les industries chimiques, notamment comme matières premières pour la synthèse de molécules organiques plus complexes. Par exemple, le méthylmercaptan (CH_3SH) est utilisé comme matière première dans la synthèse de la méthionine, acide aminé essentiel utilisé dans l'alimentation animale. Le méthylmercaptan est également utilisé dans la synthèse de disulfures de dialkyles, en particulier dans la synthèse du disulfure de diméthyle (DMS), additif de sulfuration de catalyseurs d'hydrotraitement de coupes pétrolières, entre autres applications.

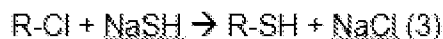
La synthèse industrielle des mercaptans, et en particulier du méthylmercaptan, se fait généralement selon un procédé connu, à partir d'alcools et de sulfure d'hydrogène à température élevée en présence d'un catalyseur selon l'équation (1) suivante :



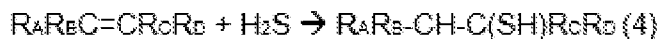
Cependant, cette réaction donne lieu à la formation de sous-produits, tels que les sulfures selon l'équation (2) suivante :



La synthèse de mercaptans peut également se faire à partir de dérivés halogénés et de sulfhydrates alcalins, alcalinoterreux ou d'ammonium selon l'équation (3) suivante (exemple donné avec un dérivé chloré et un sulfhydrate de sodium) :



Cette seconde voie de synthèse conduit également à la présence de sulfures non désirés. Enfin, la synthèse de mercaptans peut se faire à partir d'oléfines et de sulfure d'hydrogène par catalyse acide ou par photochimie suivant que l'on souhaite obtenir un mercaptan ramifié ou non selon l'équation (4) suivante :



Une nouvelle fois, cette synthèse donne lieu à des sulfures en tant que sous-produits.

Ces sulfures sont obtenus en grande quantité au niveau industriel et sont principalement amenés à être détruits. Ceci représente une perte d'efficacité pour le procédé de production du mercaptan visé et un coût supplémentaire lié à leur destruction. Cette génération de déchets constitue un véritable problème industriel pour les producteurs de mercaptans qui cherchent donc à valoriser ces sous-produits. Cette valorisation peut être effectuée de différentes manières.

Les sulfures ont tout d'abord leur propre marché : le diméthylsulfure peut être utilisé en tant qu'arôme alimentaire ou en tant qu'agent anti-cokant dans le vapocraquage des charges pétrolières. Cependant, la demande dans ces marchés est très inférieure aux quantités produites de sulfures.

Les sulfures peuvent également être transformés en mercaptans correspondants par la réaction de sulphydrolyse. Néanmoins, les conditions requises pour réaliser cette réaction sont relativement sévères et génératrices de nouvelles réactions parasites. Cette application industrielle est donc limitée.

Enfin, un autre moyen de valorisation des sulfures produits concerne les réactions d'oxydation des sulfures pour les transformer en sulfoxydes et/ou en sulfones. De telles réactions d'oxydation chimique sont bien connues. Elles font intervenir différents types d'oxydants tels que l'eau de Javel (hypochlorite de sodium), l'eau oxygénée, l'oxygène, l'ozone ou les oxydes d'azote tels que N_2O_4 en présence de catalyseurs ou non.

Les méthodes chimiques d'oxydation des sulfures présentent toutefois de réels problèmes industriels. Un des problèmes les plus critiques est la faible chimiosélectivité de la réaction d'oxydation. A ce jour, on ne dispose pas de moyen permettant au niveau industriel d'orienter l'oxydation de façon exclusive vers les sulfoxydes ou vers les sulfones : un mélange de sulfoxydes et de sulfones est toujours obtenu à l'issue de l'oxydation des sulfures. D'autres inconvénients de ces méthodes chimiques sont par exemple l'utilisation de réactifs très puissants conduisant à des problèmes de sécurité, ou encore la faible disponibilité des oxydes d'azote (il existe très peu de fournisseurs industriels). De plus, certains de ces procédés chimiques conduisent à des problèmes de rejets de polluants, tels que les procédés utilisant les oxydes d'azote.

Outre les oxydations chimiques, les oxydations de sulfures peuvent être catalysées lors de procédés dit biologiques, par catalyse enzymatique en solution ou dans des organismes, généralement des microorganismes. Néanmoins, ces oxydations réalisées par catalyse enzymatique ne sont pas non plus sélectives quant aux produits obtenus; on obtient là aussi un mélange de sulfoxydes et de sulfones à partir des sulfures correspondants.

Ainsi, la faible sélectivité de la réaction d'oxydation des sulfures en sulfoxydes par rapport aux sulfones pose problème au niveau industriel, que ce soit avec les procédés d'oxydation chimique ou enzymatique. Il est en effet souhaitable d'avoir la plus grande sélectivité possible

envers le produit d'intérêt, que ce soit les sulfoxydes ou les sulfones, pour des raisons évidentes de coûts et de qualité.

Les travaux de Bordewick et al. proposent l'utilisation de Yarrowia monooxygénases A-H pour catalyser des réactions de sulfoxydation de sulfures aromatiques et asymétriques (S. Bordewick, *Enzyme Microb. Technol.*, 2018, 109, 31–42.). Dans cette publication, l'utilisation de techniques de mutations génétiques pour obtenir des variants de l'enzyme de départ permet de diminuer la production de la diméthylsulfone de près de 95%.

L'utilisation de telles techniques de modifications génétiques est hasardeuse et coûteuse.

De plus, ces méthodes présentent un fort taux d'échec qui se traduit par une diminution de l'activité voire une perte d'activité de l'enzyme dans son intégralité et en particulier sur le substrat d'intérêt. Une bonne sélectivité n'est donc pas garantie par de telles modifications.

Il existe donc un besoin pour un procédé de valorisation des sulfures, notamment issus de la synthèse des mercaptans, qui soit industriellement et économiquement viable.

Il existe plus particulièrement un besoin pour un procédé d'oxydation des sulfures en sulfoxydes qui soit applicable industriellement, plus économique et plus respectueux de l'environnement.

Il existe un besoin pour un procédé d'oxydation des sulfures en sulfoxydes qui soit sélectif et dont la mise en œuvre soit simple et économique sur le plan industriel.

La présente invention a pour objectif de répondre en tout ou partie aux besoins ci-dessus.

Ainsi, la présente invention concerne un procédé, de préférence sélectif, de préparation d'un sulfoxyde comprenant les étapes suivantes :

a) préparation d'une composition M comprenant :

- un sulfure ;
- une enzyme E catalysant l'oxydation dudit sulfure en sulfoxyde ;
- éventuellement au moins un cofacteur C de ladite enzyme E ; et
- un oxydant ;

b) conduite de la réaction enzymatique d'oxydation du sulfure en sulfoxyde ;

c) récupération du sulfoxyde obtenu à l'étape b) ; et

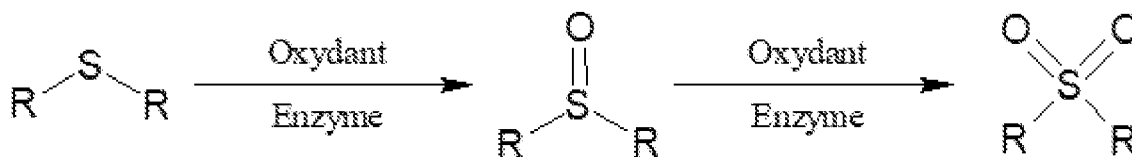
d) éventuelle séparation et/ou éventuelle purification du sulfoxyde récupéré à l'étape c) ;

dans lequel ledit sulfure n'est pas totalement consommé au cours de l'étape b) de conduite de la réaction enzymatique.

De façon surprenante, les présents inventeurs ont découvert un procédé sélectif de préparation de sulfoxydes par catalyse enzymatique. Ledit procédé permet l'obtention de sulfoxydes à partir des sulfures correspondants, en particulier sans l'obtention de sulfones (ou en quantité négligeable).

En effet, l'oxydation des sulfures par catalyse enzymatique se fait normalement selon la séquence réactionnelle suivante :

[Chem 1]



Dans le schéma ci-dessus, l'enzyme, éventuellement son(ses) cofacteur(s), et l'oxydant utilisés sont les mêmes lors de la première étape de formation du sulfoxyde et lors de la seconde étape de formation de la sulfone. Au sein du même mélange réactionnel, il est donc possible d'obtenir à la fois des sulfoxydes et des sulfones, ce qui n'est pas souhaitable comme indiqué ci-dessus.

Les présents inventeurs ont découvert un procédé permettant d'obtenir sélectivement des sulfoxydes, en diminuant voire en supprimant les sous-produits obtenus et en particulier les sulfones. Les inventeurs ont ainsi déterminé le moyen d'obtenir des sulfoxydes sans obtenir de sulfones (c'est-à-dire sans que l'enzyme n'oxyde les sulfoxydes obtenus en sulfones).

De façon surprenante, il a été découvert que l'oxydation des sulfures en sulfoxydes est prioritaire et exclusive par rapport à l'oxydation des sulfoxydes en sulfones. Ainsi, tant que des sulfures sont présents dans le milieu réactionnel (soit par exemple dans la composition M telle que définie ci-dessus), les sulfoxydes sont formés sélectivement, sans formation de sulfones. Les sulfoxydes sont transformés en sulfones lorsque le milieu réactionnel (soit par exemple la composition M telle que définie ci-dessus) ne contient plus de sulfures mais uniquement des sulfoxydes.

Grâce à l'invention, il est donc possible de contrôler facilement la production de sulfoxydes ou de sulfones de façon sélective et ce sans avoir à modifier les conditions opératoires du procédé.

Définitions

Le terme « (C₁-C₂₀)alkyle » désigne des hydrocarbures aliphatiques saturés, qui peuvent être linéaires ou ramifiés et comprennent de 1 à 20 atomes de carbone. De préférence, les alkyles comprennent de 1 à 12 atomes de carbone, voire de 1 à 4 atomes de carbone. On peut citer par exemple le méthyle, l'éthyle, le n-propyle, l'isopropyle, le n-butyle, l'isobutyle, le sec-butyle ou le tert-butyle. Par « ramifié », on entend qu'un groupement alkyle est substitué sur la chaîne alkyle principale.

Le terme « (C₂-C₂₀)alcényle » désigne un alkyle tel que défini ci-dessus, comprenant au moins une double liaison carbone-carbone.

Le terme « (C₂-C₂₀)alcynyle » désigne un alkyle tel que défini ci-dessus, comprenant au moins une triple liaison carbone-carbone.

Le terme « (C₆-C₁₀)aryle » désigne des composés aromatiques hydrocarbonés monocycliques, bicycliques ou tricycliques, en particulier le phényle et le naphthyle.

Le terme « (C₃-C₁₀)cycloalkyle » désigne des hydrocarbures aliphatiques saturés comprenant de 3 à 10 atomes de carbone, monocycliques ou bicycliques tels que le cyclopropyle, le cyclobutyle, le cyclopentyle ou le cyclohexyle.

On entend par (C₃-C₁₀)hétérocycloalcane, un cycloalcane comprenant de 3 à 10 atomes de carbone et comprenant au moins un atome de soufre, de préférence le tétrahydrothiophène, et éventuellement au moins un autre hétéroatome.

On entend par (C₄-C₁₀)hétéroarène, un arène comprenant entre 4 et 10 atomes de carbone et comprenant au moins un atome de soufre, par exemple le thiophène, et éventuellement au moins un autre hétéroatome.

On entend notamment par hétéroatome, un atome choisi parmi O, N, S, Si, P et les halogènes.

On entend généralement par « catalyseur » une substance accélérant une réaction et qui se retrouve inchangée à la fin de cette réaction. Selon un mode de réalisation, ladite enzyme E catalyse la réaction d'oxydation des sulfures en sulfoxydes.

Par « quantité catalytique », on entend notamment une quantité suffisante pour catalyser une réaction, en particulier pour catalyser l'oxydation des sulfures en sulfoxydes. Plus particulièrement, un réactif utilisé en quantité catalytique est utilisé en plus petite quantité, par exemple entre environ 0,01% et 20 % en poids, par rapport à la quantité en poids d'un réactif utilisé en proportion stœchiométrique.

La sélectivité d'une réaction représente généralement le nombre de moles de produit formé, par exemple le nombre de moles de sulfoxyde formé, par rapport au nombre de moles de réactif consommé suite à la réaction, par exemple le nombre de moles de sulfure consommé. Les définitions usuelles de la conversion, de la sélectivité et du rendement sont les suivantes :

Conversion = (nombre de moles de réactif à l'état initial – nombre de moles de réactif restant après la réaction) / (Nombre de moles de réactif à l'état initial)

Sélectivité = Nombre de moles de réactif converti en produit souhaité / (Nombre de moles de réactif à l'état initial – nombre de moles de réactif restant après la réaction)

Rendement = Conversion X Sélectivité

Ainsi, on entend notamment par « procédé sélectif de préparation de sulfoxydes », un procédé consommant des sulfures et produisant des sulfoxydes, sans formation de sulfones

(ou avec formation d'une quantité négligeable de sulfones). Selon un mode de réalisation, la réaction d'oxydation des sulfures en sulfoxydes est chimiosélective.

Par exemple, le procédé selon l'invention, en particulier l'étape b), permet d'obtenir une sélectivité comprise entre 95% et 100%, de préférence entre 99% et 100% pour les sulfoxydes.

Procédé

Le procédé selon l'invention peut être un procédé sélectif, voire chimiosélectif, de préparation de sulfoxydes. De préférence, ledit procédé ne conduit pas à la formation des sulfones correspondantes.

Selon un mode de réalisation, c'est l'étape b) et plus particulièrement la réaction enzymatique d'oxydation des sulfures en sulfoxydes conduite à l'étape b) qui est sélective, de préférence chimiosélective.

Selon un mode de réalisation, ladite composition M comprend toujours une quantité de sulfure suffisante pour que l'enzyme E transforme le sulfure en sulfoxyde, de préférence sans formation de sulfone. Selon un mode de réalisation, le sulfure est fourni en excès dans la composition M.

La quantité de sulfure restant après l'étape b) de conduite de la réaction enzymatique peut être comprise entre 0,0001% et 99,9% en poids, de préférence entre 0,1% et 99% en poids, de préférence entre 1% et 50% en poids, par exemple entre 1% et 10% en poids, par rapport à la quantité de sulfure de départ en poids, c'est-à-dire de l'étape a).

Plus particulièrement, la composition M comprend :

- une quantité stœchiométrique d'un sulfure ;
- une quantité catalytique de l'enzyme E ;
- éventuellement une quantité catalytique d'au moins un cofacteur C ; et
- une quantité sous-stœchiométrique de l'oxydant.

Sulfure :

On entend notamment par sulfure un sulfure organique, soit tout composé organique comprenant au moins une fonction de type -C-S-C-.

Selon un mode de réalisation, la composition M comprend au moins un sulfure. Elle peut par exemple comprendre un, deux ou plusieurs sulfures différents. Ledit sulfure peut être symétrique, c'est-à-dire que l'atome de soufre représente un centre de symétrie par rapport au composé.

Selon un mode de réalisation, ledit sulfure est de formule générale suivante :



dans laquelle,

R₁ et R₂ peuvent être identiques ou différents et sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi le groupe constitué de :

(C₁-C₂₀)alkyle, (C₂-C₂₀)alcényle, (C₂-C₂₀)alcynyle, (C₃-C₁₀)cycloalkyle et (C₆-C₁₀)aryle ou R₁ et R₂ forment un cycle avec l'atome de soufre auquel ils se rattachent, de préférence un groupement (C₃-C₁₀)hétérocycloalcane ou (C₆-C₁₀)hétéroarène ;
lesdits groupements alkyle, alcényle, alcynyle, cycloalkyle, aryle, hétérocycloalcane et hétéroarène pouvant éventuellement être substitué(s) par un ou plusieurs substituant(s) ;
et lesdits groupements alkyle, alcényle, alcynyle, cycloalkyle et aryle pouvant comprendre un ou plusieurs hétéroatome(s).

Lesdits groupements alkyle, alcényle, alcynyle, cycloalkyle, aryle, hétérocycloalcane et hétéroarène peuvent éventuellement être substitué(s) par un ou plusieurs substituant(s) choisi(s) parmi le groupe constitué de :

(C₁-C₂₀)alkyle, (C₃-C₁₀)cycloalkyle et (C₆-C₁₀)aryle ;

et peuvent être éventuellement fonctionnalisés par une ou plusieurs fonction(s) choisie(s), de manière non limitative et à titre d'exemples, parmi les fonctions alcool, aldéhyde, cétone, acide, amide, nitrile, ester ou encore les fonctions porteuses de soufre, phosphore et silicium. Selon un mode de réalisation, lesdits groupements alkyle, alcényle, alcynyle, cycloalkyle, aryle, hétérocycloalcane et hétéroarène peuvent éventuellement être substitué(s) par un ou plusieurs substituant(s) choisi(s) parmi le groupe constitué de : (C₁-C₂₀)alkyle, (C₃-C₁₀)cycloalkyle, (C₆-C₁₀)aryle, -OH, -C(O)OH, -C(O)H, -C(O)-NH₂, -NH₂, -NHR, -NRR', -C(O)-, -C(O)-NHR', -C(O)-NRR', -COOR et -CN ;

dans lesquels R et R' représentent indépendamment l'un de l'autre un groupement (C₁-C₂₀)alkyle.

Selon un mode de réalisation préféré, R₁ et R₂, peuvent être identiques ou différents et sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi le groupe constitué de :

(C₁-C₂₀)alkyle, (C₂-C₂₀)alcényle, (C₂-C₂₀)alcynyle et (C₃-C₁₀)cycloalkyle ou

R₁ et R₂ forment ensemble avec l'atome de soufre auquel ils se rattachent un groupement (C₃-C₁₀)hétérocycloalcane.

De préférence, R₁ et R₂ sont choisis parmi les (C₁-C₂₀)alkyle ou R₁ et R₂ forment ensemble avec l'atome de soufre qui les porte un (C₃-C₁₀)hétérocycloalcane. Les radicaux R₁ et R₂ dudit sulfure sont de préférence identiques (i.e. formant ainsi un sulfure symétrique).

Plus préférentiellement, le sulfure est choisi parmi le diméthylsulfure, le diéthylsulfure, le dipropylsulfure, le dibutylsulfure, le dioctylsulfure, le didodécylsulfure, et le tétrahydrothiophène. Le diméthylsulfure est particulièrement préféré selon l'invention. Selon un mode de réalisation, le sulfure est symétrique et n'est donc pas prochiral. Selon un mode de réalisation, le sulfure n'est pas le tert-butyl méthyl sulfure (CAS Number 6163-64-0).

Oxydant :

On entend par oxydant tout composé pouvant oxyder un sulfure en sulfoxyde.

L'oxydant peut être choisi parmi le groupe constitué de l'air, de l'air appauvri en oxygène, de l'air enrichi en oxygène, de l'oxygène pur et du peroxyde d'hydrogène. Selon un mode de réalisation particulier, l'oxydant est choisi parmi le groupe constitué de l'air, de l'air appauvri en oxygène, de l'air enrichi en oxygène et de l'oxygène pur lorsque l'enzyme E est une mono- ou une dioxygénase et du peroxyde d'hydrogène lorsque l'enzyme E est une peroxydase. Lorsque l'oxydant se présente sous forme gazeuse, il est présent dans la composition M sous forme de gaz dissout. Le pourcentage d'oxygène dans l'air enrichi ou appauvri est choisi en fonction de la vitesse de réaction et de la compatibilité avec le système enzymatique de façon connue de l'homme du métier.

L'oxydant peut être en quantité sous-stœchiométrique dans la composition M. Ainsi, le sulfure présent est en partie consommé avec l'oxydant lors de la réaction enzymatique conduite à l'étape b) mais pas totalement.

Lorsque de l'air (air qui peut être appauvri ou enrichi en oxygène) est utilisé, c'est évidemment l'oxygène compris dans l'air qui est consommé au cours de la réaction enzymatique conduite à l'étape b) en tant qu'oxydant.

A l'issue de ladite réaction, généralement l'oxygène est transformé en eau lorsque l'enzyme E utilisée est une mono-oxygénase ou totalement consommé lorsque l'enzyme E est une dioxygénase. Le peroxyde d'hydrogène est quant à lui transformé en eau suite à l'action de la peroxydase. Ainsi, le procédé selon l'invention est particulièrement avantageux en termes de rejet et de respect de l'environnement.

Enzyme E :

Ladite enzyme E peut être une oxydoréductase, de préférence une oxydoréductase choisie parmi le groupe constitué des monooxygénases, des dioxygénases et des peroxydases, encore plus préférentiellement parmi les monooxygénases.

De préférence, ladite enzyme E est une Baeyer-Villiger Monooxygénase (BVMO).

Encore plus préférentiellement et parmi les BVMOs, l'enzyme E peut être une Cyclohexanone Monooxygénase (CHMO), et plus particulièrement une Cyclohexanone-1,2-MonoOxygénase ou une Cyclopentanone Monooxygénase (CPMO), et plus particulièrement une cyclopentanone 1,2-monooxygénase.

Les Cyclohexanone-1,2-Monooxygénases sont notamment de classe EC 1.14.13.22.

Selon un mode de réalisation particulier, la CHMO est une CHMO d'*Acinetobacter sp.* (par exemple de souche NCIMB 9871) et/ou une CHMO codée par le gène *chnB* appartenant au cluster AB006902.

Les Cyclopentanone 1,2-Monooxygénase sont notamment de classe EC 1.14.13.16.

Selon un mode de réalisation particulier, la CPMO est une CPMO de *Comamonas sp.* (par exemple la souche NCIMB 9872) et/ou une CHMO codée par le gène *cpnB*.

La monooxygénase peut également être une hydroxyacétophénone monooxygénase (HAPMO) et plus particulièrement une 4-hydroxyacétophénone monooxygénase.

Les hydroxyacétophénone monooxygénases sont notamment de la classe EC 1.14.13.84. Selon un mode de réalisation particulier, l'HAPMO est une HAPMO de *Pseudomonas fluorescens*. codée par le gène *hapE*.

Cofacteur(s) C :

On entend notamment par « cofacteur C » un cofacteur nécessaire à l'activité catalytique de l'enzyme E telle que définie ci-dessus et/ou permettant d'améliorer son activité catalytique.

Selon un mode de réalisation, un, deux cofacteurs C ou plus sont présents dans la composition M. Par exemple, il est possible d'ajouter à la composition M un cofacteur C déjà présent naturellement dans l'enzyme E, en supplément d'un autre cofacteur C.

Lorsque l'oxydoréductase est une peroxydase, il est possible de n'ajouter aucun cofacteur C dans la composition M. Les cofacteurs nicotiniques et/ou flaviniques peuvent être utilisés lorsque l'enzyme E appartient à la famille des mono ou di-oxygénases.

Ledit au moins un cofacteur C peut être choisi parmi les cofacteurs nicotiniques et les cofacteurs flaviniques. En particulier, ledit au moins un cofacteur C peut être choisi parmi le groupe constitué de : la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP), la flavine mononucléotide (FMN), la flavine adénine dinucléotide (FAD) et/ou leur forme réduite correspondante (à savoir NADH,H⁺ NADPH,H⁺, FMNH₂, FADH₂).

Les cofacteurs C listés ci-dessus sont avantageusement utilisés sous leurs formes réduites (par exemple NADPH, H⁺) et/ou leurs formes oxydées (par exemple NADP⁺), c'est-à-dire qu'ils peuvent être ajoutés sous ces formes réduites et/ou oxydées dans la composition M.

De préférence, l'enzyme E utilisée est la Cyclohexanone Monooxygénase, par exemple la Cyclohexanone Monooxygénase d'*Acinetobacter sp.*, et le cofacteur C utilisé est le NADP, éventuellement supplémenté de FAD.

Système(s) de régénération du(des) cofacteur(s) C :

La composition M telle que définie ci-dessus peut également comprendre au moins un système de régénération du ou des cofacteur(s) C. Par « système de régénération du ou des co-facteur(s) C », on entend toute réaction ou suite de réaction chimique(s) et/ou enzymatique(s) permettant de retransformer le(s) cofacteur(s) C réduit(s) en cofacteur(s) C oxydé(s) ou vice-versa.

Par exemple, les systèmes de régénération peuvent être des systèmes oxydo-réducteurs enzymatiques connus avec utilisation d'un substrat sacrificiel. De tels systèmes impliquent l'utilisation d'une seconde enzyme (dite enzyme de recyclage) qui permet de recycler le(s) cofacteur(s) C utilisé(s) en utilisant un substrat sacrificiel.

Parmi les enzymes de recyclage, on peut citer la glucose déshydrogénase, la formate déshydrogénase, la phosphite déshydrogénase (Vrtis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, 41(17), 3257-3259) ou encore les alcools déshydrogénases (Leuchs, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 2011, 25(2), 267-281 ; Goldber, *App. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 76(2), 237).

Parmi les substrats sacrificiels qui peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention, les composés donneurs d'hydrogène sont tout particulièrement préférés, et parmi ceux-ci, les composés tout à fait adaptés sont les composés organiques réducteurs donneurs d'hydrogène porteurs de fonction hydroxyle, tels que les alcools, les polyols, les sucres et autres tels que le glucose ou le glycérol.

Par exemple, dans le cas de la CHMO, l'enzyme du système de recyclage réduit le cofacteur NADP⁺ sous la forme NADPH,H⁺ en oxydant le substrat sacrificiel.

La composition M selon l'invention peut également comprendre :

- éventuellement un ou plusieurs solvants choisis parmi l'eau, les tampons tels que les tampons phosphates, Tris-HCl, Tris-base, bicarbonate d'ammonium, acétate d'ammonium, HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique), CHES (acide N-cyclohexyl-2-aminoéthanesulfonique), ou les sels tels que le chlorure de sodium, le chlorure de potassium, ou leurs mélanges ;
- éventuellement des additifs tels que des surfactants, afin notamment de favoriser la solubilité d'un ou plusieurs réactif(s) ou substrat(s) de la réaction enzymatique.

De préférence, la composition M est une solution aqueuse. Par exemple, ladite composition M comprend entre 50 % et 99 % en poids d'eau, de préférence entre 80 % et 97 % en poids d'eau par rapport au poids total de la composition M.

Selon un mode de réalisation, la composition M est considérée comme le mélange réactionnel.

Les différents composants de la composition M préparée à l'étape a) ci-dessus sont aisément accessibles dans le commerce ou peuvent être préparés selon des techniques bien connues de l'homme du métier. Ces différents éléments peuvent se présenter sous forme solide, liquide ou gazeuse et peuvent très avantageusement être mis en solution ou dissous dans l'eau ou tout autre solvant pour être mis en œuvre dans le procédé de l'invention. Les enzymes utilisées peuvent également être greffées sur support (cas des enzymes supportées).

Selon un mode de réalisation, l'enzyme E, éventuellement ledit au moins un cofacteur C, éventuellement ledit au moins un système de régénération sont :

- soit sous forme isolée et/ou purifiée, par exemple en solution aqueuse ;
- soit compris dans un extrait brut, c'est-à-dire dans un extrait de cellules broyées ; ou
- soit compris dans des cellules entières.

De préférence, des cellules entières sont utilisées. Le ratio [sulfure] (en mmol/L) / [cellules] (en g_{cps}.L⁻¹) peut être compris entre 0,01 et 10, de préférence entre 0,01 et 3 mmol/g_{cps}, de préférence pendant l'étape b) de conduite de la réaction enzymatique. La détermination de la concentration massique en grammes de cellules sèches (g_{CPS} pour Cellules en Poids Sec ou g_{CDW} pour Cells Dry Weight en anglais) est réalisée selon des techniques classiques.

L'enzyme E peut être surexprimée ou non dans lesdites cellules, appelées ci-après cellules hôtes.

La cellule hôte peut être tout hôte approprié pour la production d'une enzyme E à partir de l'expression du gène codant correspondant. Ce gène pourra alors se trouver soit dans le génome de l'hôte, soit porté par un vecteur d'expression tels que ceux définis ci-après.

On entend notamment par « cellule hôte » au sens de la présente invention une cellule procaryote ou eucaryote. Des cellules hôtes couramment utilisées pour l'expression de protéines recombinantes ou non incluent notamment des cellules de bactéries telles que *Escherichia coli* ou *Bacillus sp.*, ou *Pseudomonas*, des cellules de levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris*, des cellules de champignons tels que *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* ou *Trichoderma reesei*, des cellules d'insectes telles que les cellules Sf9, ou encore des cellules de mammifères (notamment humaines) telles que les lignées cellulaires HEK 293, PER-C6 ou CHO.

Lesdites cellules hôtes peuvent être en phase stationnaire de croissance, par exemple sorties du milieu de culture.

De préférence, l'enzyme E et son éventuel au moins un cofacteur C sont exprimés dans la bactérie *Escherichia coli*. Préférentiellement, la CHMO est exprimée à l'intérieur d'une souche d'*Escherichia coli* comme par exemple *Escherichia coli* BL21(DE3).

Préférentiellement, l'HAPMO est exprimée à l'intérieur d'une souche d'*Escherichia coli* comme par exemple *Escherichia coli* BL21(DE3).

Dans le cas des cellules entières et/ou lysées, c'est par exemple la machinerie cellulaire qui régénère le ou les cofacteur(s) C utilisé(s). Par exemple, dans le cas d'une souche d'*Escherichia coli* exprimant la Cyclohexanone Monooxygénase (CHMO), le cofacteur C est le NADP.

Selon un mode de réalisation, lorsque la CHMO transforme le sulfure en sulfoxyde, le cofacteur C1 est le NADP, avec éventuellement le cofacteur C2 FAD. Lorsque la CHMO transforme le sulfure en sulfoxyde, le cofacteur NADPH,H⁺ est oxydé en NADP⁺, qui sera régénéré par la cellule et/ou le système de régénération mis en place. Par exemple si le milieu est supplémenté en glycérol, des enzymes naturellement présentes dans *E. coli*, notamment l'enzyme glycérol déshydrogénase, permettront la régénération du cofacteur réduit. Dans le cas d'un milieu supplémenté en glucose, les enzymes de la voie des pentoses phosphates, notamment les enzymes glucose-6-phosphate déshydrogénase et/ou acide-6-phosphogluconique déshydrogénase, naturellement présentes chez *E. coli* participeront à la régénération du cofacteur C1 réduit.

Selon l'invention, on appelle « biocatalyseur » la cellule hôte comprenant l'enzyme E, éventuellement au moins un cofacteur C et éventuellement un système de régénération du(des) cofacteur(s) C.

L'enzyme E et/ou le biocatalyseur tels que définis précédemment peuvent être obtenus selon différentes techniques connues de l'homme du métier.

Intégration d'un vecteur d'expression comprenant la séquence codante pour l'enzyme E dans l'hôte cellulaire

Lors de l'utilisation d'un vecteur d'expression tel qu'un plasmide, la transformation des cellules procaryotes et eucaryotes est une technique bien connue de l'homme du métier, par exemple par lipofection, électroporation, choc thermique, ou par des méthodes chimiques. Le vecteur d'expression et la méthode d'introduction du vecteur d'expression au sein de la cellule hôte sont sélectionnés en fonction de la cellule hôte choisie. A l'issue de cette étape de transformation, une cellule transformée exprimant un gène codant une enzyme recombinante E est obtenue. Elle peut être cultivée, lors d'une étape de culture/d'incubation, afin de produire l'enzyme E.

L'incubation/la culture des cellules procaryotes et eucaryotes est une technique bien connue de l'homme du métier qui peut déterminer par exemple, le milieu de culture ou encore les conditions de temps et de température. Selon le vecteur utilisé, une période d'induction – correspondant à une production accrue de l'enzyme E – peut être observée. L'utilisation d'inducteur faible (comme par exemple l'arabinose pour le vecteur pBad) ou fort (comme par exemple l'isopropyl β -D-1-thiogalactoside (IPTG) pour les vecteurs pET22b, pRSF, etc...) peut être envisagée. Pour vérifier que la cellule hôte produit l'enzyme E, on peut utiliser la technique d'électrophorèse SDS-PAGE ou la technique du Western blot.

On entend par « vecteur d'expression », une molécule d'ADN de taille réduite dans laquelle il est possible d'insérer une séquence nucléotidique d'intérêt. Il est possible de choisir entre plusieurs vecteurs d'expression connus tels les plasmides, les cosmides, les phages, etc ...

Le choix du vecteur se fait notamment en fonction de l'hôte cellulaire utilisé.

Il peut s'agir par exemple du vecteur d'expression décrit dans le document WO 83/004261.

Intégration de la séquence codante pour l'enzyme E dans le génome de la cellule hôte en l'absence de vecteur d'expression

La séquence nucléotidique codant l'enzyme E peut être intégrée dans le génome de la cellule hôte par toute méthode connue comme par exemple la recombinaison homologue ou encore le système CRISPR-Cas9 etc... Pour vérifier que la cellule hôte produit l'enzyme E, on peut utiliser la technique d'électrophorèse SDS-PAGE ou la technique du Western blot.

Isolation et/ou purification de l'enzyme E pour une utilisation sous forme isolée et/ou purifiée

Après transformation et culture/incubation de la cellule hôte transformée, une étape d'isolation et éventuellement de purification de l'enzyme E peut être réalisée. De cette façon, le procédé selon l'invention n'est pas réalisé en présence des cellules hôtes mais par l'enzyme E en solution dans la composition M, de préférence en solution aqueuse.

L'isolation et/ou la purification de ladite enzyme E produite peut être réalisée par tout moyen connu de l'homme du métier. Il peut s'agir par exemple d'une technique choisie parmi une électrophorèse, un tamisage moléculaire, une ultracentrifugation, une précipitation différentielle, par exemple au sulfate d'ammonium, une ultrafiltration, une filtration sur membrane ou sur gel, un échange d'ions, une séparation par interactions hydrophobes, ou une chromatographie d'affinité, par exemple de type IMAC.

Mode de lyse de la cellule hôte, préparation d'un extrait brut de cellules broyées

Le lysat cellulaire peut être obtenu selon différentes techniques connues telles que la sonication, la pression (presse de French), *via* l'utilisation d'agents chimiques (ex. triton) etc... Le lysat obtenu correspond à un extrait brut de cellules broyées.

Dans l'étape a), l'ajout des différents composants de la composition M peut se faire dans n'importe quel ordre. La préparation de la composition M peut se faire par simple mélange des différents composants.

Selon un mode de réalisation, le procédé selon l'invention comprend une étape b'), entre l'étape b) et l'étape c), d'arrêt de la réaction enzymatique par inactivation du biocatalyseur et/ou de l'enzyme E. Cette étape b') peut être réalisée par des moyens connus tels que le choc thermique (par exemple avec une température d'environ 100°C) ou osmotique,

l'application d'une forte pression, l'ajout d'un solvant permettant soit de détruire et/ou de précipiter les cellules et/ou les enzymes E, la modification du pH (soit un pH bas d'environ 2, soit un pH élevé d'environ 10).

Le sulfure peut être introduit dans la composition M à une vitesse supérieure à la vitesse de réaction de la réaction enzymatique selon l'étape b).

Selon un mode de réalisation, l'étape b) de conduite de la réaction enzymatique est réalisée à un pH compris entre 4 et 10, de préférence entre 6 et 8 et encore plus préférentiellement entre 7 et 8, par exemple 7.

Selon un mode de réalisation, l'étape b) de conduite de la réaction enzymatique est réalisée à une température comprise entre 5°C et 100°C, de préférence entre 20°C et 80°C et encore plus préférentiellement entre 25°C et 40°C.

La pression utilisée pour ladite réaction enzymatique peut aller d'une pression réduite par rapport à la pression atmosphérique à plusieurs bars (plusieurs centaines de kPa), selon les réactifs utilisés et le matériel utilisé.

Les avantages que procure le procédé de l'invention sont nombreux. Parmi ces avantages, on peut citer la possibilité de travailler en solution aqueuse, dans des conditions très douces de température et de pression et dans des conditions de pH proches de la neutralité. Toutes ces conditions sont typiques d'un procédé biocatalytique dit « vert » ou « durable ».

A l'étape c), le sulfoxyde peut être récupéré sous forme liquide ou solide. Le sulfoxyde peut être récupéré en solution aqueuse, ou sous forme liquide par décantation, voire sous forme solide par précipitation selon sa solubilité.

Pour l'étape d), les méthodes de purification dépendent des caractéristiques du sulfoxyde considéré. Ainsi, après séparation des cellules (contenant l'enzyme E) par ultrafiltration ou centrifugation, une distillation peut permettre de séparer le sulfoxyde.

Cette distillation peut se faire à pression atmosphérique, pression réduite (vide), ou sous pression plus élevée si l'homme du métier y voit un intérêt.

Une séparation membranaire peut aussi être envisagée pour diminuer la teneur en eau du mélange à distiller ou accélérer un processus de cristallisation. Si le sulfoxyde a été récupéré par décantation d'un milieu réactionnel aqueux, un séchage sur tamis moléculaire (ou tout autre méthode de séchage) peut être envisagé.

Ledit procédé peut être réalisé en batch ou en continu.

Le procédé selon l'invention peut comprendre les étapes suivantes :

a 1) préparation d'une composition comprenant :

- ladite enzyme E ;
- éventuellement ledit au moins un cofacteur C ;
- ledit oxydant ;

a 2) préparation de la composition M telle que définie ci-dessus par ajout dudit sulfure, de préférence par injection, dans la composition obtenue à l'étape a-1) ;
b) conduite de la réaction enzymatique d'oxydation du sulfure en sulfoxyde ;
c) récupération du sulfoxyde obtenu à l'étape b) ; et
d) éventuelle séparation et/ou éventuelle purification du sulfoxyde récupéré à l'étape c).
Selon une autre mise en œuvre, le procédé peut contenir les étapes suivantes :

a 1) préparation d'une composition comprenant :

- ledit sulfure ;
- ladite enzyme E ; et
- éventuellement ledit au moins un cofacteur C ;

a 2) préparation de la composition M telle que définie ci-dessus par ajout dudit oxydant, dans la composition obtenue à l'étape a-1) ;

b) conduite de la réaction enzymatique d'oxydation du sulfure en sulfoxyde ;

c) récupération du sulfoxyde obtenu à l'étape b) ; et

d) éventuelle séparation et/ou éventuelle purification du sulfoxyde récupéré à l'étape c).

Composition M

La présente invention concerne également la composition M telle que définie ci-dessus.

Les différents éléments de la composition M, en tant que telle et pour ses utilisations, sont tels que définis pour le procédé ci-dessus.

En particulier, la présente invention concerne également une composition M comprenant :

- un sulfure symétrique tel que défini ci-dessus ;
- une enzyme oxydoréductase telle que définie ci-dessus, de préférence une Baeyer-Villiger Monooxygénase (BVMO), plus préférentiellement une CycloHexanone Monooxygénase (CHMO), catalysant l'oxydation dudit sulfure symétrique en sulfoxyde symétrique ;
- éventuellement au moins un cofacteur C de ladite enzyme E tel que défini ci-dessus ; et
- éventuellement un oxydant tel que défini ci-dessus.

Plus particulièrement, la présente invention concerne une composition M comprenant :

- un sulfure de formule générale (I) suivante : R_1-S-R_2 (I)
dans laquelle R_1 et R_2 sont identiques et tels que définis ci-dessus ;
- une enzyme oxydoréductase telle que définie ci-dessus, de préférence une Baeyer-Villiger Monooxygénase (BVMO), plus préférentiellement une CycloHexanone Monooxygénase (CHMO), catalysant l'oxydation dudit sulfure (I) en sulfoxyde de

formule générale (II) suivante : $R_1-S(O)-R_2$ (II)

dans laquelle R_1 et R_2 sont identiques et tels que définis ci-dessus ;

- éventuellement au moins un cofacteur C de ladite enzyme E tel que défini ci-dessus ; et
- éventuellement un oxydant tel que défini ci-dessus.

De préférence, le sulfure est choisi parmi le diméthylsulfure, le diéthylsulfure, le dipropylsulfure, le dibutylsulfure, le dioctylsulfure, le didodécylsulfure, et le tétrahydrothiophène. Un sulfure tout particulièrement préféré est le diméthylsulfure.

Selon un mode de réalisation, ladite composition correspond à la composition M telle que définie ci-dessus, pour la mise en œuvre du procédé tel que défini ci-dessus.

Utilisations

La présente invention concerne également l'utilisation d'une enzyme oxydoréductase, de préférence une Baeyer-Villiger Monooxygénase (BVMO), de préférence encore une CycloHexanone Monooxygénase (CHMO) telle que définie ci-dessus pour l'oxydation d'un sulfure symétrique en sulfoxyde symétrique correspondant. Ladite réaction enzymatique d'oxydation est notamment sélective au sens de l'invention. Selon un mode de réalisation, le sulfure est de formule générale R_1-S-R_2 (I) et est transformé en sulfoxyde de formule générale $R_1-S(O)-R_2$ (II), dans laquelle R_1 et R_2 sont identiques et tels que définis ci-dessus.

Description des Figures

Figure 1 :

La Figure 1 représente la concentration (en mM) de diéthylsulfure (DES), diéthylsulfoxyde (DESO) et de diéthylsulfone (DESO₂) présente dans le milieu réactionnel en fonction du temps (en heure), lorsque la réaction est catalysée par l'enzyme CHMO.

L'expression « compris entre X et X » inclut les bornes limites données. Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif et ne sont pas limitatifs de la présente invention.

EXEMPLES

Exemple 1 : Synthèse sélective du diéthylsulfoxyde à partir de diéthylsulfure selon l'invention

I. Préparation du biocatalyseur :

Une souche d'*Escherichia coli* BL21(DE3) (commercialisée par Merck Millipore) exprimant le gène *chnB* inséré sur le plasmide pET22b (commercialisé par Promega, Qiagen) a été

construite. Elle permet l'expression hétérologue de la CycloHexanone MonoOxygénase (CHMO) d'*Acinetobacter sp.*

Il est entendu que ladite souche contient à la fois la CHMO, les cofacteurs de la CHMO qui sont le NADP et le FAD, et son système régénérateur.

Une pré-culture et une culture de cette souche ont été réalisées selon les techniques connues de l'homme de métier.

Après une phase d'induction déclenchée par l'ajout d'isopropyl β -D-1-thiogalactoside (IPTG) à 0,85 mmol/L en concentration finale, un certain volume de la culture est centrifugé (10 min, 5000 g, 4°C) afin d'obtenir la quantité souhaitée de cellules. Dans cet exemple, un culot de 300 UDO de cellules fraîches est alors resuspendu dans 32 mL d'un tampon phosphate 0,1 mol/L à pH 7 supplémenté de 5 g/L de glycérol. La concentration cellulaire alors obtenue est de 9,4 UDO/mL ou encore 3 g_{CPS}/L (avec CPS : cellules en poids sec).

II. Bioconversion :

Dans une fiole de 250 mL contenant 32 mL du milieu décrit ci-dessus, la concentration initiale de diéthylsulfure (DES) est mesurée à 4,5 mmol/L à t=0.

A des temps réguliers, 50 μ L du milieu réactionnel sont prélevés et dilués dans 1450 μ L d'une solution d'acétonitrile contenant 25 mg/L d'undécane (étalon interne). Après centrifugation (5 min, 12 500 g), le surnageant est injecté en CPG (chromatographie en phase gaz) afin de mesurer quantitativement le diéthylsulfoxyde (DESO) et la diéthylsulfone (DESO₂) formés au cours de la réaction. Dans les conditions de l'analyse pratiquée, la concentration minimale pouvant être mesurée est de 30 μ M.

Les analyses montrent un changement de chimio-sélectivité à 2,5 h de réaction. Avant ce point, une augmentation linéaire de la quantité de DESO est mesurée sans que la sulfone ne soit détectée. La vitesse d'oxydation du sulfure sur cette partie est alors de 4 mmol de DES oxydé par litre de milieu et par heure.

Après 3h, une augmentation linéaire de la quantité de DESO₂ est observée en même temps que la consommation du DESO, le DESO₂ se forme à une vitesse de 2,8 mmol/L/h. A 6h de réaction, seul le DESO₂ est présent.

Ainsi la formation de DESO₂ intervient lorsque le DES n'est plus détecté dans le milieu.

Cet exemple montre que la réaction d'oxydation des sulfures en sulfoxydes est chimiosélective tant que le sulfure est présent dans le milieu réactionnel (cf. Figure 1).

La sélectivité obtenue est d'environ 100%.

D'une part, lorsque le DES est toujours présent dans le milieu réactionnel, la sulfone n'est pas détectée avec les outils analytiques utilisés.

D'autre part, lorsque le DES n'est plus détecté dans le milieu réactionnel, l'oxydation du DESO est totale. A la fin de la réaction ($t=5h$), environ 100% de DESO₂ est obtenu sans que le DESO soit détecté par les outils analytiques utilisés.

Par extrapolation, le ratio [sulfure] (en mmol/L) / [cellules] (en gcps.L⁻¹) calculé est de 0,06 mmol/gcps à $t=2,5$.

Exemple 2 :

I. Préparation du biocatalyseur :

La même souche que celle décrite dans l'exemple 1 a été utilisée dans cet exemple.

Cette fois-ci une plus grande quantité de cellules a été utilisée.

A l'issue de l'étape d'induction, la DO₆₀₀ est mesurée à 8,4 UDO/mL et un volume de 102 mL est prélevé afin d'obtenir après centrifugation (10 min, 5000 g, 4°C) un culot contenant 860 UDO de cellules fraîches. Ce culot est alors resuspendu dans 32 mL d'un tampon phosphate 0,1 mol/L pH 7 supplémenté de 0,5 g/L de glycérol. Une concentration cellulaire de 27 UDO/mL (ou environ 9 gcps/L) est alors obtenue.

II. Bioconversion :

Dans une fiole de 250 mL contenant 32 mL du milieu décrit ci-dessus, une concentration en diéthylsulfoxyde (DESO) de 11,3 mmol/L est mesurée dans le milieu réactionnel. A $t=2h$, le DES en solution éthanolique est ajoutée : une concentration en DES de 10,4 mmol/L est alors mesurée.

Le suivi de la réaction se fait en pratiquant les deux échantillonnages décrits dans l'exemple 1. Les analyses montrent qu'entre 0 et 2h de réaction, seul le DESO₂ est produit à partir du DESO ajouté initialement (une concentration de 7,7 mmol/L est alors obtenue). Après l'ajout de DES à $t=2h$, la concentration de DESO₂ ne varie plus jusqu'au moins 4,5 h alors que dans le même temps le DESO est produit (10,4 mmol/L sont produits). A 16,5h de réaction, seul le DESO₂ est présent (le DESO ayant été totalement oxydé).

Ainsi, en ajoutant le DES, la formation de la sulfone (ici le DESO₂) s'interrompt.

Cet exemple montre que l'oxydation du sulfure en sulfoxyde est non seulement prioritaire mais exclusive par rapport de la réaction d'oxydation du sulfoxyde en sulfone.

Exemple 3 : Oxydation enzymatique de diméthylsulfure (DMS)**I. Préparation du biocatalyseur :**

Le biocatalyseur (CHMO) est identique à celui de l'exemple 1 et est produit selon les conditions décrites dans ledit exemple 1.

II. Bioconversion

Les conditions de bioconversion présentées dans l'exemple 1 sont identiques à celles utilisées pour cet exemple à la différence du sulfure utilisé. Dans cet exemple, une solution éthanolique de DMS est utilisée pour obtenir une concentration en sulfure initiale de 4,5 mM.

Le suivi de la réaction se fait selon la méthode présentée en exemple 1.

De manière surprenante, le biocatalyseur utilisé conduit aux mêmes caractéristiques d'oxydation. A savoir, une oxydation chimiosélective du DMS tant que ce dernier est présent dans le milieu (pas de diméthylsulfone détectée) puis une oxydation du sulfoxyde se produit à partir du moment où le DMS n'est plus détecté dans le milieu.

Outre cette chimiosélectivité, une vitesse d'oxydation du sulfure du même ordre de grandeur (par rapport au DES) a été obtenue sur les premiers temps de réaction : 3,9 mmol de DMS sont oxydées par litre de milieu et par heure. De plus, la vitesse de formation de la sulfone est de 1 mmol/L/h.

Exemple 4 : Oxydation enzymatique du méthyléthylsulfure (MES)**I. Préparation du biocatalyseur :**

Le biocatalyseur (CHMO) est identique à celui de l'exemple 1 et est produit selon les conditions décrites dans ledit exemple 1.

II. Bioconversion

Les conditions de bioconversion présentées dans l'exemple 1 sont identiques à celles utilisées pour cet exemple à la différence du sulfure utilisé. Dans cet exemple, une solution éthanolique de MES est utilisée pour obtenir une concentration en sulfure initiale de 4,5 mM.

Le suivi de la réaction se fait selon la méthode présentée en exemple 1.

De manière surprenante, le biocatalyseur utilisé conduit aux mêmes caractéristiques d'oxydation. A savoir, une oxydation chimiosélective du MES tant que ce dernier est présent dans le milieu (pas de méthyléthylsulfone détectée) puis une oxydation du méthyléthylsulfoxyde se produit à partir du moment où le MES n'est plus détecté dans le milieu.

Outre cette chimiosélectivité, une vitesse d'oxydation du même ordre de grandeur (par rapport aux autres sulfures) a été obtenue sur les premiers temps de réaction : 3,6 mmol de MES sont oxydées par litre de milieu et par heure. De plus, la vitesse de production de la sulfone est de 3,5 mmol/L/h.

Exemple 5 : Oxydation enzymatique du tétrahydrothiophène (THT)

I. Préparation du biocatalyseur :

Le biocatalyseur (CHMO) est identique à celui de l'exemple 1 et est produit selon les conditions décrites dans ledit exemple 1.

II. Bioconversion

Les conditions de bioconversion présentées dans l'exemple 1 sont identiques à celles utilisées pour cet exemple à la différence du sulfure utilisé. Dans cet exemple, une solution éthanolique de THT est utilisée pour obtenir une concentration en sulfure initiale de 4,5 mM.

Le suivi de la réaction se fait selon la méthode présentée en exemple 1.

De manière surprenante, le biocatalyseur utilisé conduit aux mêmes caractéristiques d'oxydation. A savoir, une oxydation chimiosélective du THT tant que ce dernier est présent dans le milieu (pas de sulfolane détecté, qui est la sulfone correspondante) puis une oxydation du tétrahydrothiophène-1-oxyde se produit à partir du moment où le THT n'est plus détecté dans le milieu.

Outre cette chimiosélectivité, une vitesse d'oxydation du même ordre de grandeur (par rapport aux autres sulfures) a été obtenue sur les premiers temps de réaction : 3,4 mmol de

THT sont oxydés par litre de milieu et par heure. De plus, la vitesse de formation de la sulfone est de 1,5 mmol/L/h.

Exemple 6 : Oxydation enzymatique d'un mélange de sulfures selon l'invention

I. Préparation du biocatalyseur :

La même souche que celle décrite dans l'exemple 1 a été utilisée dans cet exemple.

A l'issue de l'étape d'induction, la DO_{600} est mesurée à 8,4 UDO/mL et un volume de 31 mL est prélevé afin d'obtenir après centrifugation (10 min, 5000 g, 4°C) un culot contenant 300 UDO de cellules fraîches. Ce culot est alors resuspendu dans 32 mL d'un tampon phosphate 0,1 mol/L pH 7 supplémenté de 0,5 g/L de glycérol. Une concentration cellulaire de 9,4 UDO/mL (ou environ 3 g_{CPS}/L) est alors obtenue.

II. Bioconversion :

Dans une fiole de 250 mL contenant 32 mL du milieu décrit ci-dessus, 75 µL de solutions éthanoliques de diéthylsulfure (DES), diméthylsulfure (DMS) et tétrahydrothiophène (THT) chacun à 3,64 M sont introduits en même temps : c'est le début de la réaction.

Le suivi de la réaction se fait en pratiquant le même échantillonnage décrit dans l'exemple 1. Les analyses montrent que durant une première période, les sulfures du mélange sont oxydés en sulfoxydes sans que les sulfones ne soient détectées. De manière surprenante la vitesse d'oxydation du DES est supérieure à celles des deux autres sulfures présents (le DMS et le THT) qui ont tous deux la même vitesse d'oxydation (cf. tableau 1 ci-dessous).

[Tableau 1]

Susbrat	DMS	DES	THT
Vitesse de formation du sulfoxyde (mmol/L/h)	0,5	2,5	0,55
Vitesse de formation de la sulfone (mmol/L/h)	-	1,5	0,6

Ce n'est que dans un second temps, quand les sulfures ne sont plus détectés dans le milieu réactionnel que les sulfones correspondantes sont obtenues, à l'exception du DMSO₂ qui n'a pas été détecté dans ces conditions en mélangeant les différents sulfures.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'un sulfoxyde comprenant les étapes suivantes :
 - a) préparation d'une composition M comprenant :
 - un sulfure ;
 - une enzyme E catalysant l'oxydation dudit sulfure en sulfoxyde ;
 - éventuellement au moins un cofacteur C de ladite enzyme E ; et
 - un oxydant ;
 - b) conduite de la réaction enzymatique d'oxydation du sulfure en sulfoxyde ;
 - c) récupération du sulfoxyde obtenu à l'étape b) ; et
 - d) éventuelle séparation et/ou éventuelle purification du sulfoxyde récupéré à l'étape c) ;dans lequel ledit sulfure n'est pas totalement consommé au cours de l'étape b) de conduite de la réaction enzymatique.
2. Procédé de préparation selon la revendication 1, dans lequel ladite enzyme E est une oxydoréductase, de préférence une oxydoréductase choisie parmi le groupe constitué des monooxygénases, des dioxygénases et des peroxydases, encore plus préférentiellement parmi les monooxygénases.
3. Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ladite enzyme E est une Baeyer-Villiger Monooxygénase (BVMO), de préférence une Cyclohexanone Monooxygénase (CHMO) ou une Cyclopentanone Monooxygénase (CPMO).
4. Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ledit sulfure est de formule générale suivante :
$$R_1-S-R_2 \text{ (I)}$$
dans laquelle,
 R_1 et R_2 peuvent être identiques ou différents et sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi le groupe constitué de :
(C₁-C₂₀)alkyle, (C₂-C₂₀)alcényle, (C₂-C₂₀)alcynyle, (C₃-C₁₀)cycloalkyle et (C₆-C₁₀)aryle
ou
 R_1 et R_2 forment ensemble avec l'atome de soufre auquel ils se rattachent un hétérocycloalkane ou un hétéro-arène ;
lesdits groupements alkyle, alcényle, alcynyle, cycloalkyle, aryle, hétérocycloalkane et hétéro-arène pouvant éventuellement être substitué(s) par un ou plusieurs substituant(s) ;

et lesdits groupements alkyle, alcényle, alcynyle, cycloalkyle et aryle pouvant comprendre un ou plusieurs hétéroatome(s).

5. Procédé de préparation selon la revendication 4, dans lequel les radicaux R_1 et R_2 dudit sulfure sont identiques.
6. Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ledit sulfure est choisi parmi le diméthylsulfure, le diéthylsulfure, le dipropylsulfure, le dibutylsulfure, le dioctylsulfure, le didodécylsulfure, et le tétrahydrothiophène, de préférence le diméthylsulfure.
7. Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le ratio [sulfure] (en mmol/L) / [cellules] (en $g_{cps} \cdot L^{-1}$) est compris entre 0,01 et 10, de préférence entre 0,01 et 3 mmol/ g_{cps} .
8. Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'oxydant est choisi parmi le groupe constitué de l'air, de l'air appauvri en oxygène, de l'air enrichi en oxygène, de l'oxygène pur et du peroxyde d'hydrogène.
9. Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le cofacteur C est choisi parmi les cofacteurs nicotiniques et les cofacteurs flaviniques.
10. Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'enzyme E est la Cyclohexanone Monooxygénase et le cofacteur C est le NADP et éventuellement le FAD.
11. Composition comprenant :
 - un sulfure symétrique ;
 - une enzyme oxydoréductase, de préférence une Baeyer-Villiger Monooxygénase (BVMO), plus préférentiellement une Cyclohexanone Monooxygénase (CHMO), catalysant l'oxydation dudit sulfure symétrique en sulfoxyde symétrique ;
 - éventuellement au moins un cofacteur C de ladite enzyme E ; et
 - éventuellement un oxydant.

12. Composition selon la revendication 11 dans laquelle le sulfure (I) est choisi parmi le diméthylsulfure, le diéthylsulfure, le dipropylsulfure, le dibutylsulfure, le dioctylsulfure, le didodécylsulfure, et le tétrahydrothiophène, de préférence le diméthylsulfure.
13. Utilisation d'une enzyme oxydoréductase, de préférence une Baeyer-Villiger Monooxygénase (BVMO), de préférence encore une Cyclohexanone Monooxygénase (CHMO) pour l'oxydation d'un sulfure symétrique en sulfoxyde symétrique.

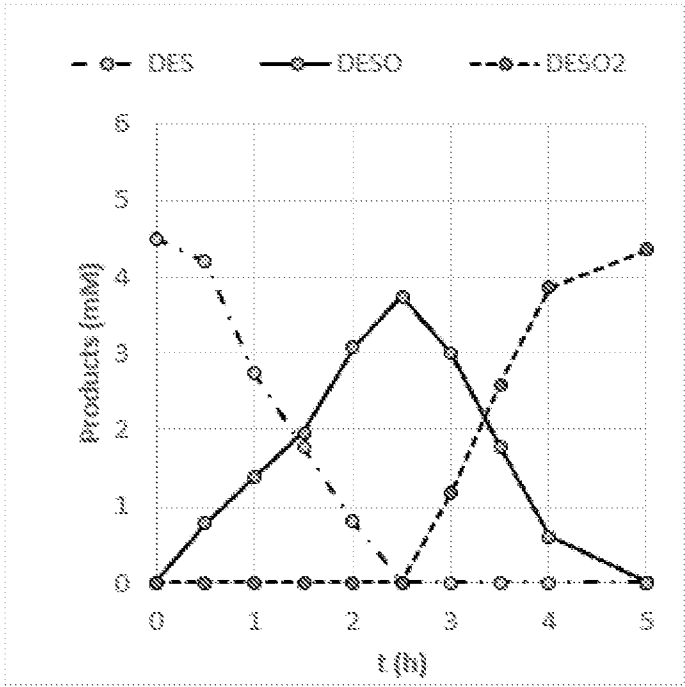


FIGURE 1|

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2020/051013

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C12P 11/00*(2006.01)i; *C12P 17/00*(2006.01)i; *C12N 9/02*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P; C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GIACOMO CARREA ET AL. "Effects of Substrate Structure on the Enantioselectivity and Stereochemical Course of Sulfoxidation Catalyzed by Cyclohexanone Monooxygenase" <i>TETRAHEDRON: ASYMMETRY</i> , Vol. 3, No. 8, 01 January 1992 (1992-01-01), pages 1063-1068 XP055670690 abstract diagram; page 1064 page 1065 - page 1067; table I	1-13
X	CAROL CUMMINGS RYERSON ET AL. "Mechanistic studies on cyclohexanone oxygenase" <i>BIOCHEMISTRY</i> , Vol. 21, No. 11, 25 May 1982 (1982-05-25), pages 2644-2655 DOI: 10.1021/bi00540a011 ISSN: 0006-2960, XP055670564 page 2647, right-hand column, paragraph 2 page 2645, right-hand column, paragraph 3	1-13
X	WO 2011071982 A2 (CODEXIS INC [US]; BONG YONG KOY [SG] ET AL.) 16 June 2011 (2011-06-16) claim 23 paragraphs [0117], [0118]	1-4, 7-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 September 2020

Date of mailing of the international search report

07 October 2020

Name and mailing address of the ISA/EP

European Patent Office
p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk
Netherlands

Telephone No. (+31-70)340-2040

Facsimile No. (+31-70)340-3016

Authorized officer

Schröder, Gunnar

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 109402074 A (ASYMCHEM LABORATORIES TIANJIN CO LTD) 01 March 2019 (2019-03-01) abstract; claim 8 paragraph [0024] - paragraph [0030]	1-4, 8, 9
X	YAN ZHANG ET AL. "Discovery of Two Native Baeyer-Villiger Monooxygenases for Asymmetric Synthesis of Bulky Chiral Sulfoxides" <i>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY</i> , US, Vol. 84, No. 14, e00638-18, 11 May 2018 (2018-05-11), pages 1-10 DOI: 10.1128/AEM.00638-18 ISSN: 0099-2240, XP055670572 abstract reference signs 21-33; page 2	1-4, 8, 9
X	MASAE HORINOUCI ET AL. "Cloning and characterization of genes encoding an enzyme which oxidizes dimethyl sulfide in <i>Acinetobacter</i> sp. strain 20B" <i>FEMS MICROBIOLOGY LETTERS</i> , GB, Vol. 155, No. 1, 17 October 1997 (1997-10-17), pages 99-105 DOI: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12692.x ISSN: 0378-1097, XP055670734 paragraph [3.6.]	1, 2, 4-9, 11-13
X	BENJAMIN ADAMS ET AL. "Reactions of Dimethylsulfoxide Reductase from <i>Rhodobacter capsulatus</i> with Dimethyl Sulfide and with Dimethyl Sulfoxide: Complexities Revealed by Conventional and Stopped-Flow Spectrophotometry +" <i>BIOCHEMISTRY</i> , Vol. 38, No. 26, 01 June 1999 (1999-06-01), pages 8501-8511 DOI: 10.1021/bi9902034 ISSN: 0006-2960, XP055670726 page 8504, left-hand column, paragraph 2	1, 2, 4-6, 8, 11-13
X	ROSTAMI AMIN ET AL. "Laccase-TEMPO as an efficient catalyst system for metal- and halogen-free aerobic oxidation of thioethers to sulfoxides in aqueous media at ambient conditions" <i>CATALYSIS COMMUNICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL</i> , Vol. 111, 01 April 2018 (2018-04-01), pages 59-63 DOI: 10.1016/J.CATCOM.2018.03.032 ISSN: 1566-7367, XP085386940 abstract diagram; page 60, paragraph 2. page 61; table 2	1, 2, 4-6, 11-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/FR2020/051013

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2011071982	A2	16 June 2011	CN	102884178	A	16 January 2013
				EP	2510089	A2	17 October 2012
				SG	181535	A1	30 July 2012
				SI	2510089	T1	31 December 2015
				US	2013017580	A1	17 January 2013
				US	2015056668	A1	26 February 2015
				US	2016076008	A1	17 March 2016
				US	2016319252	A1	03 November 2016
				WO	2011071982	A2	16 June 2011
CN	109402074	A	01 March 2019	NONE			

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2020/051013

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12P11/00 C12P17/00 C12N9/02 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12P C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	GIACOMO CARREA ET AL: "Effects of Substrate Structure on the Enantioselectivity and Stereochemical Course of Sulfoxidation Catalyzed by Cyclohexanone Monooxygenase", TETRAHEDRON: ASYMMETRY, vol. 3, no. 8, 1 janvier 1992 (1992-01-01), pages 1063-1068, XP055670690, abrégé schéma; page 1064 page 1065 - page 1067; tableau I ----- -/-	1-13
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
29 septembre 2020	07/10/2020	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Schröder, Gunnar

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CAROL CUMMINGS RYERSON ET AL: "Mechanistic studies on cyclohexanone oxygenase", BIOCHEMISTRY, vol. 21, no. 11, 25 mai 1982 (1982-05-25), pages 2644-2655, XP055670564, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi00540a011 page 2647, colonne de droite, alinéa 2 page 2645, colonne de droite, alinéa 3 -----	1-13
X	WO 2011/071982 A2 (CODEXIS INC [US]; BONG YONG KOY [SG] ET AL.) 16 juin 2011 (2011-06-16) revendication 23 alinéas [0117], [0118] -----	1-4,7-10
X	CN 109 402 074 A (ASYMCHEM LABORATORIES TIANJIN CO LTD) 1 mars 2019 (2019-03-01) abrégé; revendication 8 alinéa [0024] - alinéa [0030] -----	1-4,8,9
X	YAN ZHANG ET AL: "Discovery of Two Native Baeyer-Villiger Monooxygenases for Asymmetric Synthesis of Bulky Chiral Sulfoxides", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 84, no. 14, e00638-18, 11 mai 2018 (2018-05-11), pages 1-10, XP055670572, US ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.00638-18 abrégé références 21-33; page 2 -----	1-4,8,9
X	MASAE HORINOUCI ET AL: "Cloning and characterization of genes encoding an enzyme which oxidizes dimethyl sulfide in Acinetobacter sp. strain 20B", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 155, no. 1, 17 octobre 1997 (1997-10-17), pages 99-105, XP055670734, GB ISSN: 0378-1097, DOI: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12692.x alinéa [3.6.] ----- -/--	1,2,4-9, 11-13

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BENJAMIN ADAMS ET AL: "Reactions of Dimethylsulfoxide Reductase from Rhodobacter capsulatus with Dimethyl Sulfide and with Dimethyl Sulfoxide: Complexities Revealed by Conventional and Stopped-Flow Spectrophotometry +", BIOCHEMISTRY, vol. 38, no. 26, 1 juin 1999 (1999-06-01), pages 8501-8511, XP055670726, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi9902034 page 8504, colonne de gauche, alinéa 2 -----	1,2,4-6, 8,11-13
X	ROSTAMI AMIN ET AL: "Laccase-TEMPO as an efficient catalyst system for metal- and halogen-free aerobic oxidation of thioethers to sulfoxides in aqueous media at ambient conditions", CATALYSIS COMMUNICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 111, 1 avril 2018 (2018-04-01), pages 59-63, XP085386940, ISSN: 1566-7367, DOI: 10.1016/J.CATCOM.2018.03.032 abrégé schéma 1; page 60, alinéa 2. page 61; tableau 2 -----	1,2,4-6, 11-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2020/051013

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2011071982	A2	16-06-2011	CN 102884178 A 16-01-2013
			EP 2510089 A2 17-10-2012
			SG 181535 A1 30-07-2012
			SI 2510089 T1 31-12-2015
			US 2013017580 A1 17-01-2013
			US 2015056668 A1 26-02-2015
			US 2016076008 A1 17-03-2016
			US 2016319252 A1 03-11-2016
			WO 2011071982 A2 16-06-2011

CN 109402074	A	01-03-2019	AUCUN
