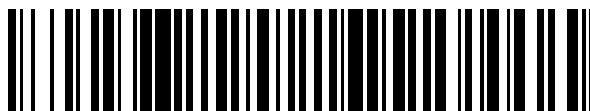


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 020**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/22** (2006.01)

**C12N 9/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2015 PCT/EP2015/079177**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16096579**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2015 E 15823596 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 3234164**

54 Título: **Método para la conversión enzimática de un sustrato de fenol en un producto de catecol correspondiente**

30 Prioridad:

**17.12.2014 GB 201422508**

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

**01.10.2019**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE DUBLIN NATIONAL  
UNIVERSITY OF IRELAND, DUBLIN (100.0%)  
Belfield  
Dublin 4, IE**

72 Inventor/es:

**O'CONNOR, KEVIN;  
MOLLOY, SUSAN;  
DAVIS, REETA y  
SHAW, WESLEY**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 726 020 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para la conversión enzimática de un sustrato de fenol en un producto de catecol correspondiente

5 **Introducción**

La tirosinasa es un tipo de enzima polifenol oxidasa ampliamente distribuida en la naturaleza y tiene varias funciones biológicas y aplicaciones biotecnológicas. En presencia de oxígeno molecular, la tirosinasa cataliza dos tipos de reacción: la hidroxilación de monofenoles para dar *o*-difenoles (actividad monofenolasa) y la posterior oxidación de *o*-difenoles para dar *o*-quinonas (actividad difenolasa). Las quinonas reactivas se autopolimerizan (de manera no enzimática) para dar las melaninas macromoleculares que son responsables de la pigmentación cutánea y capilar, el pardeamiento de frutas y la cicatrización en plantas y artrópodos. La tirosinasa tiene amplia especificidad de sustrato y puede aceptar muchos tipos de fenoles y difenoles (catecoles). Entre los fenoles sustituidos puede actuar sobre fenoles sustituidos en 3 y 4 pero los fenoles sustituidos en 2 son inhibidores competitivos de la enzima.

La capacidad de las tirosinasas para convertir monofenoles en *o*-difenoles ha motivado estudios en cuanto a la producción de diversos *o*-difenoles que son precursores importantes para la síntesis de productos farmacéuticos, productos químicos para la agricultura, aromas, inhibidores de polimerización, tintas y antioxidantes. Los halocatecoles son sintones interesantes debido a su actividad biológica así como a una variedad de reacciones de intercambio halógeno-metal y de acoplamiento cruzado a partir de compuestos intermedios de halocatecol para permitir la síntesis de elementos estructurales de catecoles funcionalizados. Por ejemplo, el fluorocatecol es potencialmente un precursor valioso para la síntesis de productos farmacéuticos, tales como las catecolaminas adrenérgicas y las aminas biogénicas. La síntesis de catecol sustituido por medios químicos es complicada debido al empleo de reactivos agresivos, condiciones de reacción intensas y escaso rendimiento. Aunque la tirosinasa tiene gran potencial como medio biológico para sintetizar estos catecoles, el uso de tirosinasas para la síntesis de catecol ha estado limitado debido a la baja razón de actividad monofenolasa con respecto a difenolasa, en la que no se favorece la acumulación de catecoles.

El hidroxitirosol es un antioxidante altamente deseado usado en alimentos, cosméticos y medicina. La autoridad europea de seguridad alimentaria emitió una declaración en 2011 apoyando determinadas afirmaciones realizadas acerca de los beneficios para la salud del hidroxitirosol. El precio del hidroxitirosol es alto debido al difícil procedimiento de producción (por ejemplo extracción a partir de hojas de olivo, síntesis química y extracción a partir de aguas residuales de almazaras). La pureza de la mayoría de productos que contienen hidroxitirosol es baja (< 80% y a menudo menos del 30%) con compuestos fenólicos y otros contaminantes presentes. La baja calidad y el alto coste están limitando la aplicación del hidroxitirosol. El uso de un biocatalizador tal como tirosinasa permitiría obtener hidroxitirosol de alta calidad.

Se ha notificado un procedimiento químico para la producción de hidroxitirosol a partir de tirosol pero con una conversión de tan sólo el 50% a una concentración de 6 mM (documento EP1623960). Células enteras de *P. aeruginosa* pueden transformar tirosol en hidroxitirosol (rendimiento del 80-96% a 25 mM) pero producen subproductos indeseados (ácido *p*-hidroxifenilacético y ácido 3,4-dihidroxifenilacético) lo que aumenta la complejidad y el coste del procedimiento posterior (Allouche *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 2004, 70, págs. 2105-2109; Boullagui y Sayadi, J. Agric. Food Chem., 2006, 54, págs. 9906-9911). Además *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que añade coste a los procedimientos de control biológico dentro de una planta de producción. Es improbable que se use para producir aditivos alimentarios tales como hidroxitirosol.

El documento ES2320505 describe un procedimiento para obtener L-DOPA a partir de L-tirosina usando la enzima tirosinasa NP\_518485 de la bacteria *Ralstonia solanacearum*. Molloy *et al.* (Biotechnol. Bioeng. 2013, 110, págs. 1849-1857) describen una enzima de tirosina modificada por ingeniería de *Ralstonia solanacearum* para una eficiencia catalítica mejorada hacia D-tirosina usando mutagénesis aleatoria y dirigida al sitio.

El documento US2003180833 (D1) describe la bioconversión de tirosol en hidroxitirosol usando una enzima tirosinasa derivada de champiñón. Aunque el procedimiento proporciona altos rendimientos, los tiempos de reacción eran muy lentos, requiriendo una conversión de 1 g de tirosol usando 15 mg de tirosinasa de champiñón en una reacción de un litro 5 h para completar la reacción. Además, las preparaciones de tirosinasa de champiñón comercial se inhiben por encima de 10 g/l de tirosol y no pueden completar la reacción. La bibliografía científica notifica la inhibición de la tirosinasa de champiñón por ácido ascórbico a 5 mM (Golan-Goldhirsh y Whitaker, J. Agric. Food Chem., 1984, 32, págs. 1003-1009; Marín-Zamora *et al.*, J. Biotechnol., 2009, 139, págs. 163-168). La tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* puede actuar como biocatalizador como una célula entera, lisado celular en bruto o enzima purificada. Los dos primeros métodos de preparación de biocatalizador son fáciles y ofrecen ventajas con respecto a la tirosinasa de champiñón usada en una preparación purificada. Se ha sugerido que es posible un sistema en discontinuo repetido para la conversión de tirosol (5 g/l) en hidroxitirosol (Bouallagui y Sayedi J. Agric. Food Chem., 2006, 54 (26), págs. 9906-9911) pero los rendimientos son del 85% en una serie única y el biocatalizador pierde el 60% de su actividad después de 3 series dando como resultado malos rendimientos, bajas concentraciones globales y dejando altas concentraciones del sustrato en el producto final. Por tanto, se necesitará procesamiento posterior complicado para lograr un hidroxitirosol altamente puro. Además los ciclos repetidos son tediosos. Otra variación con

respecto al método de alimentación en discontinuo reivindica la retirada repetida de producto con perlas (Brouk y Fishman, J Mol Catal B: Enzym 84:121-127) pero esto dio como resultado baja concentración de producto y menos del 50% de rendimiento.

- 5 Brooks *et al.* (Enzyme and Microbial Technology, vol. 39, n.º 2, 26 de junio de 2006 y Applied Microbiology and Biotechnology vol. 64, 2004, páginas 486-492) describen un procedimiento enzimático para convertir tirosol o un halofenol en el producto de catecol correspondiente, y el uso de una tirosinasa de *Pseudomonas putida* F6 para catalizar la reacción. Los rendimientos para la reacción fueron del 77% usando una concentración de sustrato de tirosol 1 mM, pero se redujeron hasta el 5% cuando la concentración de sustrato se aumentó hasta tirosol 2,5 mM, debido a la inhibición de sustrato.

Un objetivo de la invención es superar al menos uno de los problemas mencionados anteriormente.

### Sumario de la invención

- 15 El solicitante ha identificado una enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* que puede convertir tirosol en un hidroxitirosol a una concentración muy alta (hasta 150 mM) y velocidad (hasta 9,3 g/l/h), en comparación con cualquier otro biocatalizador (el mejor a 25 mM y 0,4 g/l/h) (figuras 2-4). Las velocidades de conversión de tirosol en los catecoles correspondientes usando enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* son mucho mayores que la velocidad de conversión para L-tirosina, el sustrato natural. El solicitante también ha demostrado que la tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* puede convertir 4-halofenoles en los 4-halocatecoles correspondientes con velocidades de conversión de 4 g/l/h y rendimientos de producto (>92%) que son mayores que los notificados previamente usando tirosinasa o cualquier otra enzima (figura 5). El método de la presente invención requiere 12,9 mg de tirosinasa de *R. solanacearum* para completar la biotransformación de 1 g de tirosol en una reacción de un litro en 20 min (15 veces más rápido que la tirosinasa de champiñón comercial). Además, el método de la invención demuestra reacciones a alta concentración de sustrato que no se habían logrado hasta ahora. La tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* demuestra una alta tolerancia a sustrato (27,6 g/l de tirosol) y producto (30,8 g/l de hidroxitirosol). No se observó ninguna inhibición de actividad de tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* por la sal de sodio de ácido ascórbico (hasta 400 mM). La tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* puede actuar como biocatalizador como una célula entera, lisado celular en bruto o enzima purificada. Los dos primeros métodos de preparación de biocatalizador son fáciles y ofrecen ventajas con respecto a la tirosinasa de champiñón usada en una preparación purificada.

- Por consiguiente, la invención proporciona un método para la conversión enzimática de un sustrato de fenol en un producto de catecol correspondiente, en el que el sustrato de fenol se selecciona de tirosol y un 4-halofenol, comprendiendo el método las etapas de incubar el sustrato de fenol con una enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum*, o un derivado funcional de la misma, en una mezcla de reacción, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la enzima convierta al menos algo del sustrato de fenol en el producto de catecol y en el que la mezcla de reacción comprende ácido ascórbico, y en el que el derivado funcional es una variante modificada por ingeniería de la enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* que tiene de 1 a 5 alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum*, en el que la o cada alteración se selecciona de inserción, adición, delección y sustitución de un aminoácido.

- 45 Cuando el sustrato de fenol es un tirosol, el producto de catecol es hidroxitirosol. Cuando el sustrato de fenol es un halofenol, el producto de catecol es un halocatecol.

- Preferiblemente, la mezcla de reacción comprende de 100 mM a 300 mM de ácido ascórbico. En una realización, la mezcla de reacción comprende hasta 400 mM de ácido ascórbico. En una realización, el ácido ascórbico se proporciona como sal, preferiblemente ascorbato de sodio.

- 50 De manera adecuada, la variante modificada por ingeniería de enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* se selecciona del grupo que consiste en RVC10, RV145 y C10\_N322S, cuyos detalles se describen en Molloy *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 2013, 110, págs. 1849-1857. En una realización, el derivado funcional es la enzima modificada por ingeniería RV145.

- 55 En una realización, la enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum*, o derivado funcional de la misma, se proporciona como una célula entera, lisado celular en bruto o enzima purificada. En una realización, la enzima se inmoviliza sobre un soporte.

- 60 Normalmente, la concentración de sustrato es de al menos 10 mM. En una realización, la concentración de sustrato es de al menos 100 mM. En una realización, la concentración de sustrato es de al menos 150 mM. En una realización, la concentración de sustrato es de al menos 175 mM.

- 65 De manera adecuada, el método implica una etapa de separar producto de catecol de la enzima. En una realización, la etapa de separación comprende una etapa de filtración en membrana. En una realización, la etapa de separación comprende una etapa de extracción con disolvente. En una realización la separación se realiza usando una fase sólida para unir y extraer el producto de catecol del medio de biotransformación acuoso.

En una realización, la enzima convierte el 90% del sustrato de fenol en el producto de catecol. En una realización, la enzima convierte el 100% del sustrato de fenol en el producto de catecol.

- 5 La invención también se refiere a un producto de catecol seleccionado de hidroxitirosol y un 4-halocatecol producido según el método de la invención.

### Breve descripción de las figuras

- 10 Figura 1: hidroxilación de halofenoles mediante la actividad monofenolasa y oxidación de halocatecoles mediante la actividad difenolasa de la tirosinasa

Figura 2: biotransformación de 20 mM de tirosol en matraces de agitación usando enzimas WT y RV145 (20 µg/ml) en presencia de sal de sodio de ácido ascórbico 40 mM (TY: tirosol, HT: hidroxitirosol).

- 15 Figura 3: biotransformación de tirosol en hidroxitirosol mediante la enzima RV145 modificada por ingeniería. a: biotransformación de 75 mM de tirosol usando enzima RV145 modificada por ingeniería purificada en presencia de sal de sodio de ácido ascórbico 150 mM. B: biotransformación de 100 mM de tirosol usando lisado libre de células de *E. coli* que alberga la enzima RV145 modificada por ingeniería en presencia de sal de sodio de ácido ascórbico 200 mM.

Figura 4: biotransformación de 150 mM de tirosol usando lisado libre de células en bruto de *E. coli* que alberga la enzima RV145 modificada por ingeniería en presencia de sal de sodio de ácido ascórbico 300 mM.

- 25 Figura 5a: biotransformación de 10 mM de 4-fluorofenol en matraces de agitación usando enzimas WT y RV145 (20 µg/ml) en presencia de sal de sodio de ácido ascórbico 20 mM. b: biotransformación de 10 mM de 4-yodofenol en matraces de agitación usando enzimas WT y RV145 (10 µg/ml) en presencia de sal de sodio de ácido ascórbico 20 mM (4-IP: 4-yodofenol, 4-IC: 4-yodocatecol, 4-FP: 4-fluorofenol, 4-FC: 4-fluorocatecol).

- 30 Figura 6: biotransformación de 100 mM de tirosol usando tirosinasa de champiñón comercial en presencia de ácido ascórbico 200 mM. La reacción proporciona sólo el 30% de producto y se detiene una vez que se forma producto 30 mM mostrando su rendimiento mucho peor en comparación con tirosinasa de *R. solanacearum*.

### Descripción detallada de la invención

- 35 Definiciones:

“Sustrato de fenol” significa un fenol sustituido o no sustituido, especialmente un fenol sustituido en 3 o sustituido en 4. Los ejemplos de sustituyentes incluyen halógenos o sustituyentes hidroxialquilo. Los ejemplos de sustituyentes hidroxialquilo incluyen sustituyentes hidroximetilo e hidroxietilo, especialmente sustituyentes 4-hidroximetilo y 4-hidroxietilo. Normalmente, el fenol sustituido en 3 o sustituido en 4 es un 3-halofenol o 4-halofenol. Los ejemplos de halofenoles incluyen yodofenol, bromofenol, clorofenol y fluorofenol. Preferiblemente, el fenol es tirosol. Preferiblemente, el sustrato de fenol se proporciona a una concentración de hasta su solubilidad máxima en entorno acuoso. En una realización, el sustrato de fenol se selecciona de tirosol, un 3-halofenol y un 4-halofenol. En una realización, el sustrato de fenol se selecciona de tirosol y un 4-halofenol.

“Producto de catecol correspondiente” significa un catecol que se produce haciendo reaccionar un sustrato de fenol con una enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum*. Cuando el sustrato de fenol es un 4-halofenol (por ejemplo, 4-fluorofenol), el producto de catecol correspondiente es el 4-fluorocatecol correspondiente (4-fluorocatecol). Asimismo, cuando el sustrato de fenol es hidroxialquilfenol sustituido en 4 (por ejemplo, tirosol), el producto de catecol correspondiente es el hidroxialquilcatecol sustituido en 4 correspondiente (hidroxitirosol).

“Tirosol” se refiere a 4-(2-hidroxietil)fenol.

- 55 “Hidroxitirosol” significa 4-(2-hidroxietil)-1,2-bencenodiol.

“Enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum*” significa una enzima tirosinasa aislada de *Ralstonia solanacearum*. Un ejemplo de una enzima de este tipo se describe en Molloy *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 2013, 110, págs. 1849-1857. A continuación se proporcionan las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico para la enzima de tipo natural:

Secuencia de aminoácidos de enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* (SEQ ID NO: 1) (NP\_518458)

MVVRRTVLKAIAGTSVATVFAGKLTGLSAVAADAAPLRVRRNLHGMKMDPDL SAYREFV GIMKGDQTO  
 ALSWLG FANQHGT LGGYKYCPHGDWYFLPWHRGFVLMYERAVAALTYKTFAMPYWNWTE DRLLPEAFT  
 AKTYNGKTNPLYPNRNELTGPYALTD AIVGQKEVMDKIYAETNFEVFGT SRSVDRSVRPLVQNSLDPK  
 WVP MGGNQGILERTPHNTVHNNIGAFMPTAASPRDPVFMHGHGNI DRVWATWNLGRKNSTDP LWLGMK  
 FPNNYIDPQGRYTTQGVSDLLSTEALGYRYDVM PRADNKVVNNARA EHL LALFKTGDSVKLADH IRLRSV  
 LKGEHPVATAVEPLNSAVQFEAGTVTGALGADVGTGSTTEVVALIKNIRIPYNVISIRVFNLPANALDV  
 PETDPHFVTSLSFLTHAAGHDHHPSTMVNLTDTL KALNIRDNF SINLVAVPQPGVA VESSGGVTPES  
 IEVAVI

Secuencia de ácido nucleico de enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* (SEQ ID NO. 2) (gi|30407127)

TCAAATGACGGCGACCTCGATCGATTCGGGCGTCACGCCGCCGCTGCTCTCCACGGCAACGCCGGGTTGG  
 GGTACGGCCACCAGGTTGATCGAAAAGTTGTCTGCCGGATGTTGAGCGCCTTCAGCGTGTCCGTCAGGT  
 TCACCATGGTCGACGGCAGGGCATGGTGGTCTGTCTCCGCCGATGCGTCAGGAAGCTGAGCGAGGTGAC  
 GAAGTGC GGTCGGTTTCCGGCACATCGAGGTTGGCGTTCGGCAGGTTGACGAAGACCCGGATGCTGATC  
 ACGTGTAGGGGATCCTGATGTTCTTGATCAGGGCCACGACTTCGGTGGTACTGCCGGTACCAACATCCG  
 CACCCAGGGCACCCGTCACGGTGCCGGCCTCGAATGGACGGCGCTGTTGAGCGGTTGACGCGCGTGGC  
 AACCGGATGTTCCCCCTCAGCACGCTGCGCAGCCGGATATGATCGGCCAGCTTGACGCTGTCCCGGTC  
 TTGAACAGGGCCAGCAGATGCTCGGCACGGGCGTTGTTACACCTTGTGTGCGGCGCGGGCATGACGT  
 CATAGCGGTAGCCAGCGCCTCGGTGCTCAGCAGATCGCTCAGCCTTGGTGTAGTACCGGCCCTGCGG  
 ATCGATGTAGTTGTTGGGAACTTCATGCCAGCCACAGCGGGTCAGTCGAGTTCCTTGGCGCCAGCGCG  
 TTCCAGGTGGCCATAACCGGTCGATATTGCCGTGGTGCATCATGAACACCGGGTCGCGCGGCGAGGCGG  
 CGGTGGGCATGAAGGCGCCGATGTTGTTGTGGACGGTGTGTTGCGGCGTGCCTCCAGGATGCCCTGGTT  
 GCCGCTCCATCGGCACCCATTTGGGGTCGAGGCTGTTCTGTACCAGCGGCGGCCGACCGAGCGGTCG  
 ACCGAACGGCTGGTGCCGAAGACTTCGAAGTTGGTTTCGGCATAGATCTTGTCCATGACCTCCTTCTGGC  
 CGACGATGGCGTGGTGAGCGCGTAGGGGCCGGTCAGCTCATTCGGTGGGACGTCAGAGCGGGTTCGT  
 CTTGCCGTTGTAGGTCCTTGGCGGTGAAGGCTTCGGGCAGCAGGCGGTCCTCGGTCCAGTTCAGTACGGC  
 ATGGCGAAGGCTTGTAGCCGGTGAGCGCGGCCACGGCGCGCTCGTACATCAGCAGGAAGCCGCGGTGCC  
 AGGGCAGGAAGTACCAGTCGCCGTGCGGGCAGTACTTGTAGCCGCCGTTGAGCGTACCGTGCCTGGTTGGC  
 AAAGCCGAGCCAGCTCAGCGCCTGCGTCTGGTCTTGCCTTTCATGATGCCGACGAACTCGCGATAGGCC  
 GACAGGTCGGGTCGTCCATCTTCATGCCATGCAGGTTGCCCGCACGCGCAGCGGGGCGGCATCGGCCG  
 CAACAGCGGAGAGGCGGTCAGCTTGCCCGCAATACCGTGGCGACACTTGTCCCGCGATTGCCTTCAG  
 CACCGTTCACGCACGACCAT

5

“Derivado funcional de la misma” tal como se aplica a una enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* significa una variante modificada por ingeniería de enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* que normalmente puede convertir un fenol (es decir tirosol) en un catecol correspondiente (es decir, hidroxitirosol) a una concentración y velocidad que es significativamente mejor que la tirosinasa de champiñón descrita en el documento US2003180833 (D1). Ejemplos de tales variantes modificadas por ingeniería de enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* se describen en Molloy *et al.* (2013), incluyendo variantes que pueden convertir tirosol en hidroxitirosol a una concentración y velocidad que es al menos la equivalente de la enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* de tipo natural. En una realización, la variante modificada por ingeniería de enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* puede realizar una conversión del 100% de tirosol 150 mM en hidroxitirosol en el ensayo de biotransformación de tirosol descrito a continuación. En una realización, la variante modificada por ingeniería de enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* puede realizar una conversión del 100% de tirosol 175 mM en hidroxitirosol en la biotransformación de tirosol descrita a continuación. Métodos para generar y someter a prueba variantes modificadas por ingeniería de enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* resultarán evidentes para el experto en la técnica, y se describen en Molloy *et al.*

Debe entenderse que una “variante modificada por ingeniería” de la proteína de enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* significa enzimas que tienen secuencias de aminoácidos que son sustancialmente idénticas a enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* de tipo natural. Por tanto, por ejemplo, debe entenderse que el término incluye enzimas que están alteradas con respecto a uno o más residuos de aminoácido. Preferiblemente tales alteraciones implican la inserción, adición, delección y/o sustitución de 5 o menos aminoácidos, más preferiblemente de 4 o menos, incluso más preferiblemente de 3 o menos, lo más preferiblemente de sólo 1 ó 2 aminoácidos. Se prevé la inserción, adición y sustitución con aminoácidos naturales y modificados. La variante modificada por ingeniería puede tener cambios de aminoácido conservativos, en la que el aminoácido que se introduce es estructural, química o funcionalmente similar al que se sustituye. Generalmente, la variante tendrá al menos el 70% de homología de secuencia de aminoácidos, preferiblemente al menos el 80% de homología de secuencia, más preferiblemente al menos el 90% de homología de secuencia, y de manera ideal al menos el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de homología de secuencia con enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* de tipo natural. En este contexto, la homología de secuencia comprende tanto identidad como similitud de secuencia, es decir una secuencia de polipéptido que comparte el 70% de homología de aminoácidos con la enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* de tipo natural es una en la que un 70% cualquiera de residuos alineados son o bien idénticos a, o bien sustituciones

35

conservativas de, los residuos correspondientes en la enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* de tipo natural. Variantes específicas incluidas dentro del alcance de la invención son las variantes modificadas por ingeniería descritas en (Molloy *et al.*, 2013), especialmente (RVC10, RV145 y C10\_N322S). En una realización, la variante modificada por ingeniería de enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* puede realizar la conversión completa de un sustrato de tirosol en hidroxitirosol a concentraciones un orden de magnitud mayor que las notificadas previamente por cualquier tirosinasa u otro biocatalizador (por ejemplo tirosol 175 mM).

También se pretende que el término “variante modificada por ingeniería” incluya derivados químicos de enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* de tipo natural, es decir en los que uno o más residuos de la enzima de tipo natural se derivatiza químicamente mediante reacción de un grupo secundario funcional. También se incluyen dentro del término variante enzimas tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* de tipo natural en las que se sustituyen residuos de aminoácido que se producen de manera natural por análogos de aminoácidos. Ejemplos de modificaciones de cadena lateral incluyen modificación de grupos amino, tales como mediante alquilación reductora por reacción con un aldehído seguida por reducción con NaBH<sub>4</sub>; amidación con metilacetimidato; acetilación con anhídrido acético; carbamitación de grupos amino con cianato; trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS); alquilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico; y piridoxilación de lisina con piridoxa-5'-fosfato seguida por reducción con NABH<sub>4</sub>. El grupo guanidino de residuos de arginina puede modificarse mediante la formación de productos de condensación heterocíclicos con reactivos tales como 2,3-butanodiona, fenilgloxal y gloxal. El grupo carboxilo puede modificarse por activación de carbodiimida mediante formación de o-acilisourea seguida por posterior derivatización, por ejemplo, para dar una amida correspondiente. Los grupos sulfhidrilo pueden modificarse mediante métodos, tales como carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida; oxidación de ácido per fórmico para dar ácido cisteico; formación de disulfuros mixtos con otros compuestos de tiol; reacción con maleimida; anhídrido maleico u otra maleimida sustituida; formación de derivados de mercurio usando 4-cloromercuribenzoato, ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, cloruro de fenilmercurio, 2-cloromercurio-4-nitrofenol y otros compuestos de mercurio; carbamitación con cianato a pH alcalino. Los residuos de triptófano pueden modificarse, por ejemplo, mediante oxidación con N-bromosuccinimida o alquilación del anillo de indol con bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobenzilo o haluros de sulfonilo. Los residuos de tirosina pueden alterarse mediante nitración con tetranitrometano para formar un derivado de 3-nitrotirosina. La modificación del anillo de imidazol de un residuo de histidina puede lograrse mediante alquilación con derivados de ácido yodoacético o N-carboxilación con dietilpirocarbonato. Los ejemplos de incorporación de aminoácidos no naturales y derivados durante la síntesis de enzima incluyen, pero no se limitan a, el uso de norleucina, ácido 4-aminobutírico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico, ácido 6-aminohexanoico, t-butilglicina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico, 2-tienilalanina y/o D-isómeros de aminoácidos.

## Parte experimental

### Materiales y métodos

#### *Cepas, condiciones de crecimiento y purificación de tirosinasa*

Se usaron *E. coli* BL21 recombinantes para expresar el gen de tirosinasa de tipo natural (WT) de *R. solanacearum* y tres variantes modificadas por ingeniería (RV145, RVC10, C10\_N322S) del mismo gen generadas previamente por Molloy *et al.* (2013). Todas las cepas se mantuvieron en caldo de lisogenia (LB) con glicerol al 50% a -80°C. En la preparación para la inducción y la purificación de tirosinasa, las cepas de *E. coli* almacenadas a -80°C se sembraron en estrías en agar LB y se incubaron a 37°C durante 24 h. El inóculo primario se cultivó en un agitador rotatorio (200 rpm, 37°C) en 5 ml de LB durante la noche. Se usó carbenicilina (50 µg/ml) como antibiótico para el mantenimiento del plásmido a lo largo del estudio. Se indujo la producción de tirosinasa y se purificó la enzima tal como se describió anteriormente (Molloy *et al.* 2013). Se analizaron diferentes fracciones de la tirosinasa purificada mediante SDS-PAGE al 10% para confirmación de pureza y peso molecular. Se determinó la concentración de proteína mediante el método de ácido bicinconínico (Smith *et al.* 1985) usando albúmina de suero bovino como patrón.

#### *Preparación de sustratos y otros compuestos químicos*

Se adquirieron diversos sustratos de monofenol tales como 4-fluorofenol, 4-bromofenol, 4-clorofenol y 4-yodofenol de Sigma-Aldrich (Dublín, Irlanda). Se prepararon disoluciones madre (1 M) del 4-bromofenol y 4-yodofenol en etanol al 100% y se diluyeron adicionalmente disoluciones de trabajo posteriores en tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 7). De manera similar, se prepararon disoluciones madre (500 mM) de 4-fluorofenol y 4-clorofenol en agua desionizada y se prepararon disoluciones madre de trabajo en tampón fosfato 50 mM. Se adquirió tirosol de TCI Europe (Bélgica) y se prepararon disoluciones madre en tampón fosfato 50 mM. Se preparó ácido ascórbico y sal de sodio de ácido ascórbico (AA) (usada para reducir o-quinona para dar o-difenol) en agua desionizada poco antes del ensayo de biotransformación

#### *Biotransformación de fenoles 4-halogenados y tirosol*

Se llevaron a cabo biotransformaciones de halofenoles en halocatecoles correspondientes usando enzimas

purificadas (WT y variantes modificadas por ingeniería). Se llevaron a cabo diversas concentraciones (5, 10 y 20 mM) de biotransformaciones de halofenol en matraces cónicos de 100 ml con un volumen de trabajo de 20 ml a 30°C y 200 rpm en un agitador-incubador. Se llevó a cabo la biotransformación de tirosol en hidroxitirosol usando enzimas purificadas, lisado libre de células o células enteras. Se llevaron a cabo diversas concentraciones (75, 100, 150 y 175 mM) de biotransformaciones de tirosol en matraces cónicos con deflectores de 500 ml con un volumen de trabajo de 100 ml a 30°C y 200-250 rpm en un agitador-incubador. Se sometió a prueba una concentración de enzima de 2 µg/ml por 1 mM de sustrato con una razón de sustrato con respecto a ascorbato de sodio de 1:2. También se llevó a cabo la biotransformación de tirosol 100 mM en hidroxitirosol usando tirosinasa de champiñón comercial (Sigma, Irlanda) usando las condiciones especificadas anteriormente. Se extrajeron muestras (450 µl) en diversos puntos de tiempo y se añadieron inmediatamente a 50 µl de HCl 1 N enfriado con hielo. Se centrifugaron las muestras (12.000 g), se filtraron usando filtros sin jeringa Whatman Mini-UniPrep™ (0,45 µ Whatman Inc. NJ, EE.UU.), y se usó un volumen de muestra de 20 µl para todas las inyecciones de HPLC.

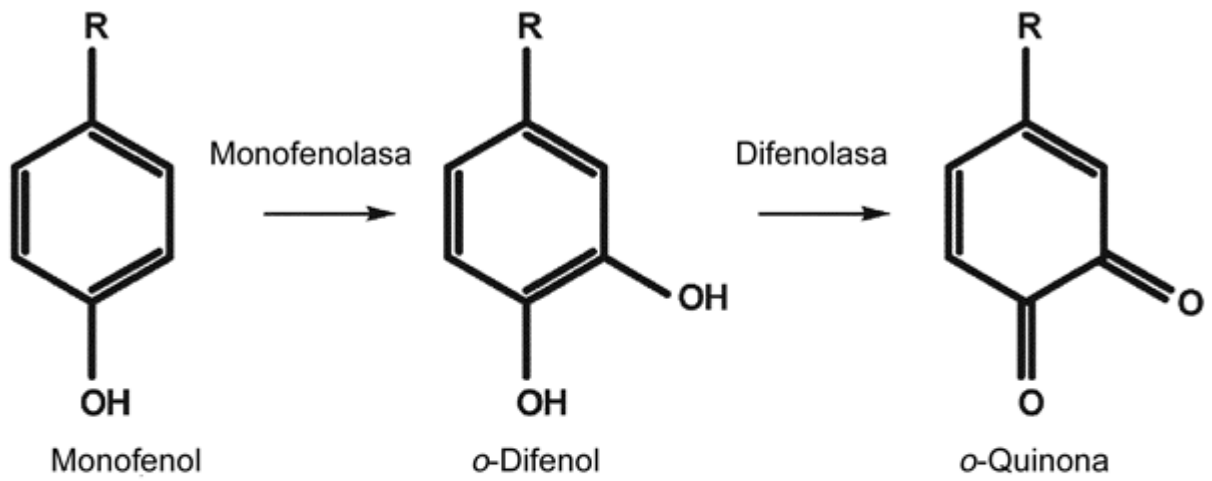
*Análisis por HPLC*

Se analizaron muestras filtradas mediante HPLC usando una columna C18 ACE 5 de 5 µm (25 cm × 4,6 mm de DI; Apex Scientific, Irlanda) y un instrumento HP1100 de Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, EE.UU.) equipado con un detector por red de diodos Agilent 1100 Series. Se eluyeron las muestras de manera isocrática a 22°C usando una mezcla de ácido fosfórico (0,1%, v/v) y metanol a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. La razón de ácido fosfórico con respecto a metanol era de 70:30 para 4-fluorofenol y de 50:50 para 4-cloro, 4-bromo y 4-yodofenol.

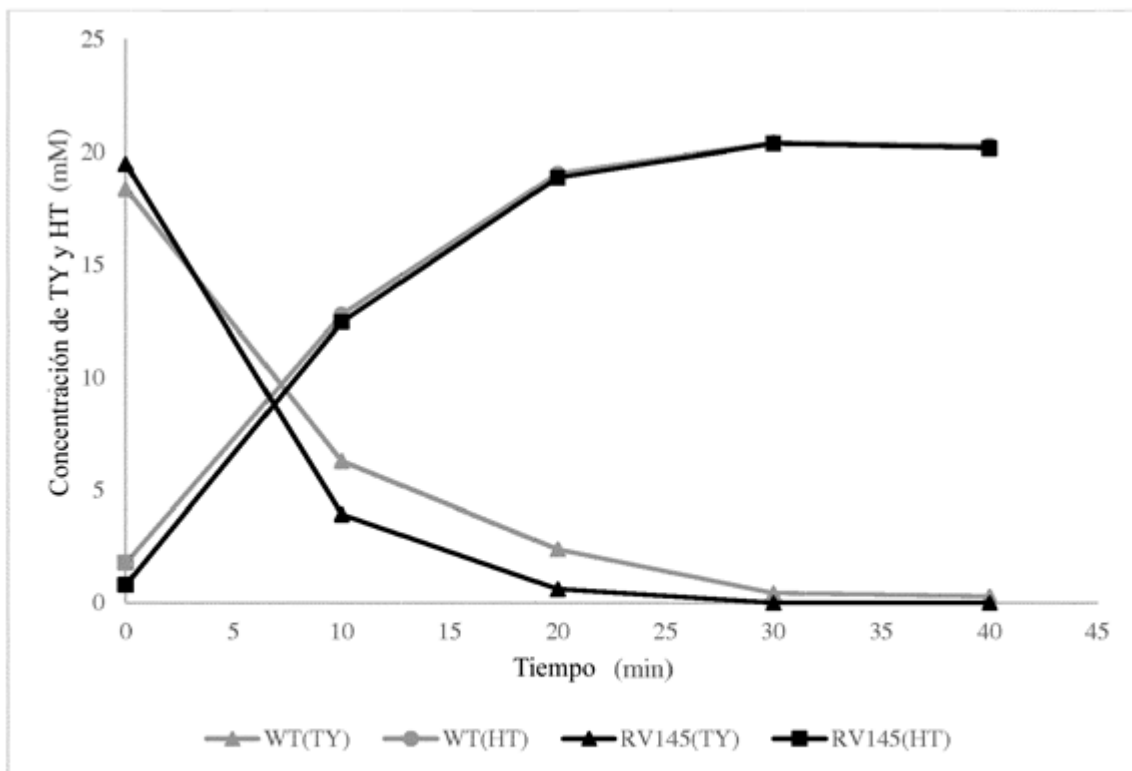
## REIVINDICACIONES

1. Método para la conversión enzimática de un sustrato de fenol en un producto de catecol correspondiente, en el que el sustrato de fenol se selecciona de tirosol y un 4-halofenol, comprendiendo el método las etapas de incubar el sustrato de fenol con una enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum*, o un derivado funcional de la misma, en una mezcla de reacción, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la enzima convierta al menos algo del sustrato de fenol en el producto de catecol y en el que la mezcla de reacción comprende ácido ascórbico, en el que el derivado funcional es una variante modificada por ingeniería de la enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* que tiene de 1 a 5 alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum*, en el que la o cada alteración se selecciona de inserción, adición, delección y sustitución de un aminoácido.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el sustrato de fenol es un tirosol y el producto de catecol es hidroxitirosol.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el sustrato de fenol es un halofenol y el producto de catecol es un halocatecol.
4. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el ácido ascórbico se proporciona como una sal.
5. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la variante modificada por ingeniería de enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* puede realizar una conversión del 100% de tirosol 175 mM en hidroxitirosol.
6. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la variante modificada por ingeniería de enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum* se selecciona del grupo que consiste en RVC10, RV145 y C10\_N322S.
7. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum*, o derivado funcional de la misma, se proporciona como un extracto a partir de una bacteria que expresa la enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum*, o derivado funcional de la misma.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum*, o derivado funcional de la misma, se proporciona como una bacteria que expresa la enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum*, o derivado funcional de la misma.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum*, o derivado funcional de la misma, se proporciona como una enzima purificada.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la enzima tirosinasa de *Ralstonia solanacearum*, o derivado funcional de la misma, se proporciona como una mezcla en bruto en forma de un extracto celular.
11. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la concentración de sustrato es de al menos 75 mM.
12. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el producto de catecol se separa de impurezas presentes en la mezcla de reacción enfriando bruscamente la mezcla de reacción después de la etapa de conversión enzimática.
13. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el producto de catecol se separa de impurezas presentes en la mezcla de reacción refrigerando o congelando la mezcla de reacción después de la etapa de conversión enzimática.

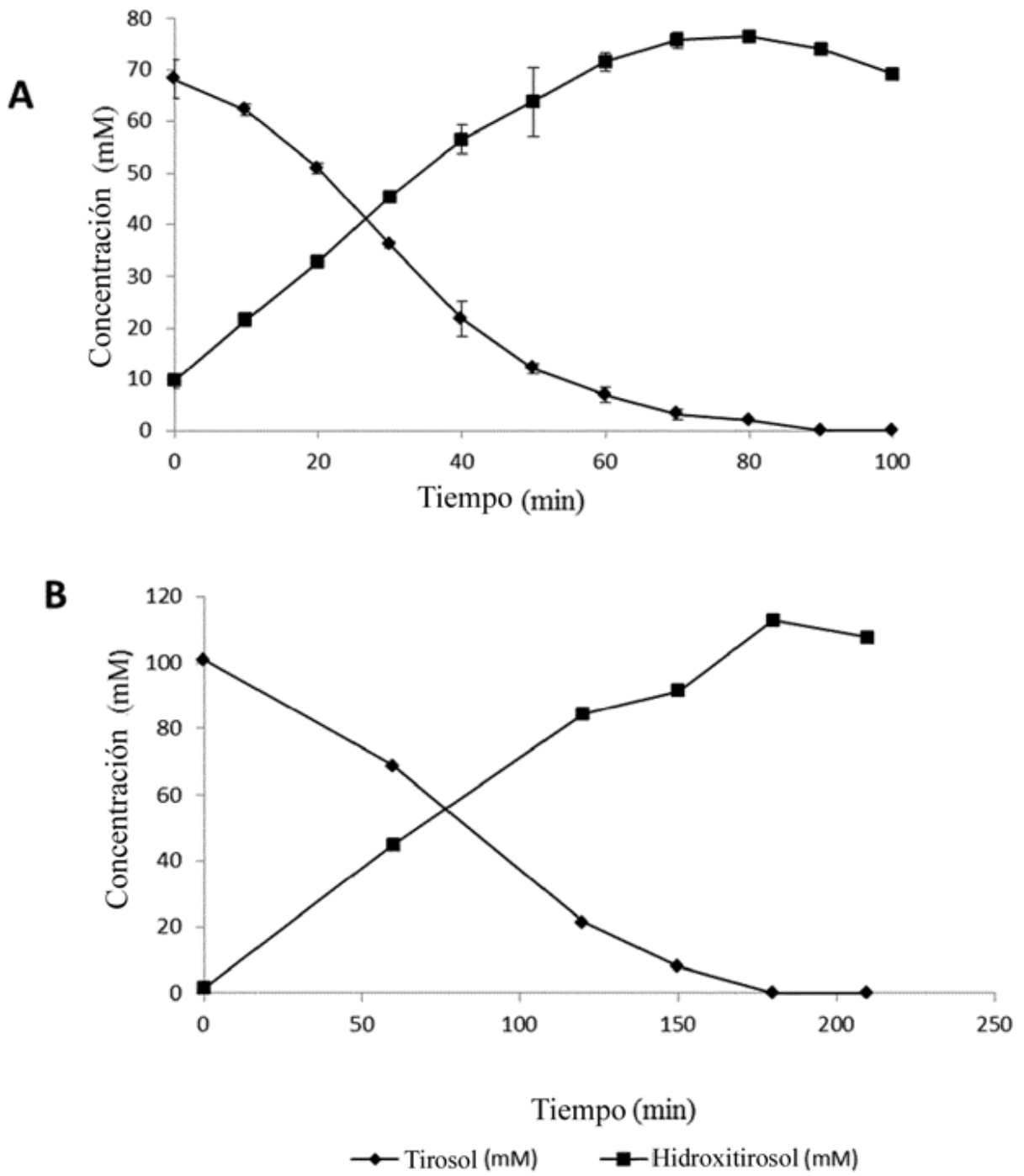




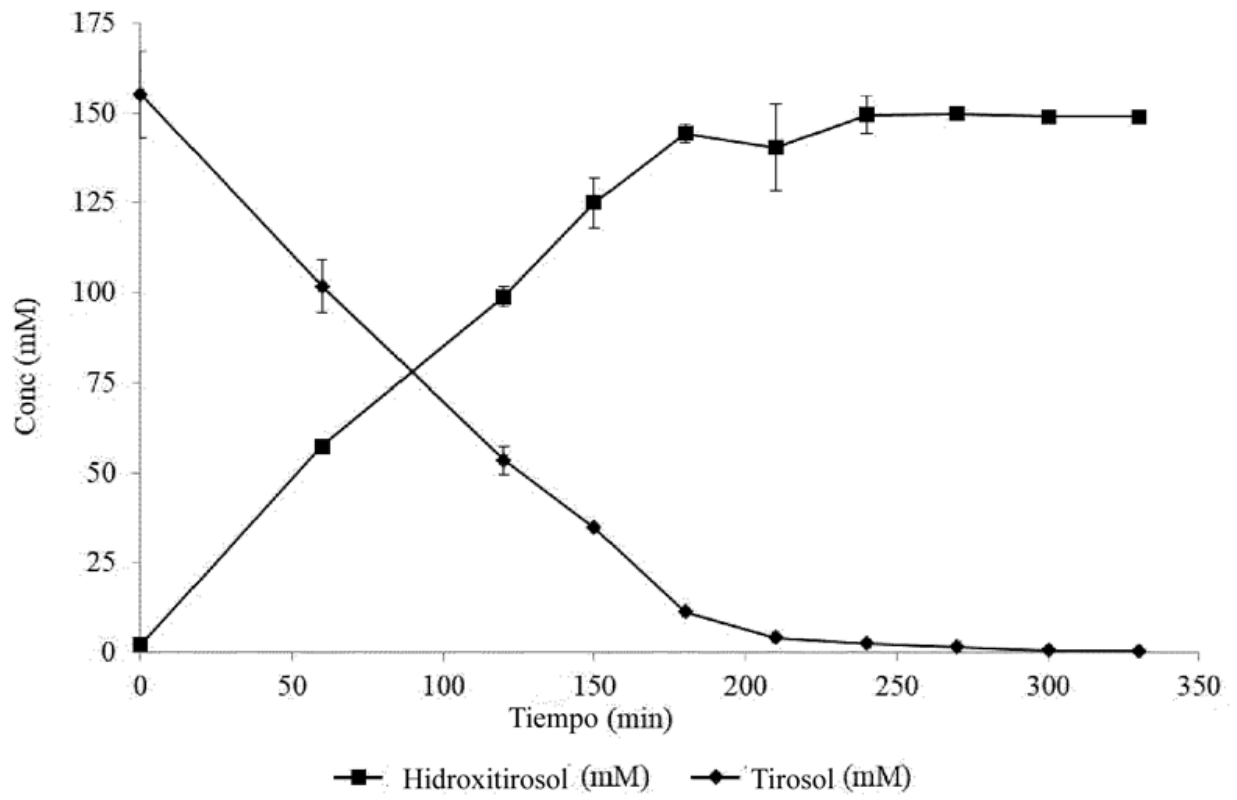
**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**

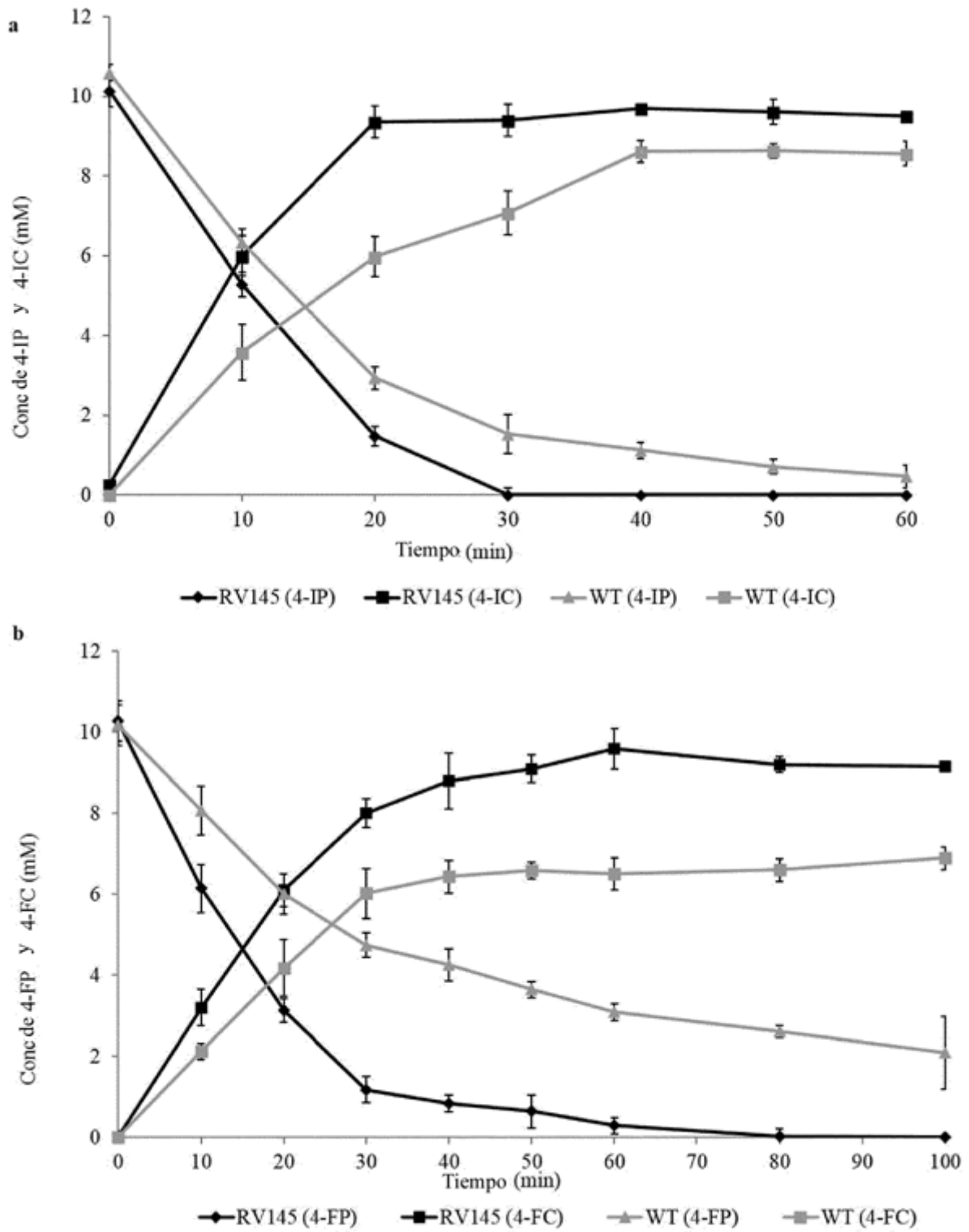
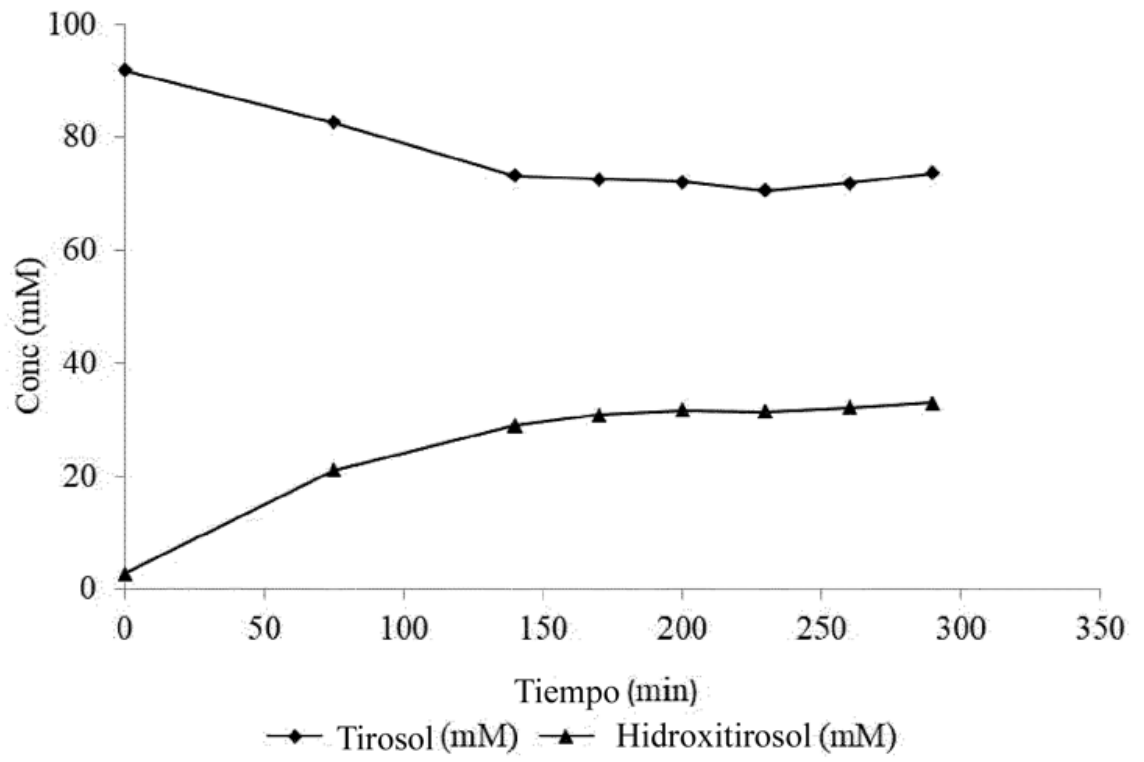


Figura 5



**Figura 6**