

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 142**

51 Int. Cl.:

C12P 7/22 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2016 PCT/FR2016/052792**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017 WO17072450**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2016 E 16809939 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3368679**

54 Título: **Proceso de preparación de un compuesto vinilfenólico a partir de un ácido hidroxicinámico precursor derivado de una torta de semillas oleaginosas**

30 Prioridad:

29.10.2015 FR 1560393

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

02.06.2020

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR
L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET
L'ENVIRONNEMENT (25.0%)**

**147 rue de l'Université
75007 Paris, FR;**

TERRES INOVIA (25.0%);

**TERRES UNIVIA L'INTERPROFESSION DES
HUILES ET PROTÉINES VÉGÉTALES (25.0%) y
UNIVERSITÉ D'AIX MARSEILLE (25.0%)**

72 Inventor/es:

LOMASCOLO, ANNE;

FINE, FRÉDÉRIC;

PEYRONNET, CORINNE;

SIGOILLOT, JEAN-CLAUDE;

ODINOT, ELISE y

NAVARRO, DAVID

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 764 142 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

Proceso de preparación de un compuesto vinilfenólico a partir de un ácido hidroxicinámico precursor derivado de una torta de semillas oleaginosas

5 La presente invención pertenece al campo de la preparación de compuestos de base biológica de valor agregado por vía microbiológica, en particular fúngica. Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de un compuesto vinilfenólico a partir de un ácido hidroxicinámico precursor derivado de un material de origen vegetal, más precisamente, derivado de una torta de semillas oleaginosas, así como a un procedimiento más global de producción de un compuesto vinilfenólico a partir de una torta de semillas oleaginosas.

10 Las tortas de semillas oleaginosas son los subproductos sólidos de la extracción de aceite de las semillas oleaginosas, como las semillas de colza, de girasol o de soja. Se componen principalmente de proteínas, materiales celulósicos y minerales. La colza y el girasol son dos de los cultivos de semillas oleaginosas más importantes del mundo. La producción mundial de torta de colza (RSM) y torta de girasol (SFM) se estimó para el año 2013 en 35,8 y 16,7 millones de toneladas, respectivamente. El uso y la recuperación de estas tortas son, por lo tanto, de gran interés económico y han sido objeto de numerosos estudios. Las tortas de colza y las tortas de girasol se han utilizado como fuente de proteínas para la alimentación animal o para la mejora del suelo.

15 Más recientemente, han surgido nuevas alternativas al uso tradicional de las tortas de semillas oleaginosas en la alimentación animal, en particular para la producción de compuestos de valor agregado de interés biotecnológico e industrial. En particular, se puede mencionar, a modo de ejemplo, la transformación de las tortas por vía química en materiales naturales compuestos y plásticos y en aditivos sintéticos; o también, en el campo microbiológico, su uso como sustratos físicos para el crecimiento microbiano, aprovechando su estructura fibrosa porosa y su adecuada composición química que constituye una fuente de carbono y nitrógeno, y rica en minerales y vitaminas. Por lo tanto, las tortas de semillas oleaginosas se pueden usar en cultivos líquidos o en fermentación sólida, para el desarrollo de diversos microorganismos, y en particular hongos filamentosos.

20 La estructura y composición de las tortas de semillas oleaginosas, en particular las tortas de girasol y de colza, también ofrece perspectivas interesantes para la producción de moléculas de plataforma de base biológica de interés industrial.

25 Por lo tanto, la técnica anterior ha propuesto varios bioprocedimientos para producir moléculas de valor agregado a partir de tortas de semillas oleaginosas. A modo de ejemplo, se puede mencionar, para tortas de colza, la producción de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes* (Chen et al. 2011, *Enzyme Microb Technol*, 48: 339-344), o de ácidos grasos poliinsaturados por *Rhodospiridium toruloides* (Kiran et al. 2013, *Biores Technol*, 129: 650-654); y, para tortas de girasol, la producción de polihidroxialcanoatos por *Cupriavidus necator* (Kachrimanidou et al. 2014, *Biores Technol*, 172: 131-130) o ácido clavulánico por *Streptomyces clavuligenes* (Sircar et al. 1998, *Process Biochem* 33: 283-289).

30 Las tortas de semillas oleaginosas son particularmente conocidas por su alto contenido de compuestos fenólicos, en particular ácidos hidroxicinámicos, como el ácido sinápico, el ácido ferúlico, el ácido cafeico, el ácido p-cumárico, etc., que están presentes allí como un éster. En particular, las tortas de colza son muy ricas en ácido sinápico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico), que representa del 90 al 95% de los compuestos fenólicos que contiene, en forma del éster de sinapina. Las tortas de girasol contienen principalmente ácido clorogénico, éster de ácido cafeico y quinina, y ácido cafeico.

35 Es probable que estos ácidos hidroxicinámicos resultantes de la modificación de la lignina contenida en las tortas constituyan precursores de compuestos de base biológica con alto valor agregado, como saborizantes, antioxidantes, moléculas de plataforma para la química verde.

40 Por ejemplo, se sabe que el canolol o el 2,6-dimetoxi-4-vinilfenol, también llamado 4-vinilsiringol, que se puede obtener por descarboxilación del ácido sinápico, es un poderoso agente antioxidante natural. Se ha informado en particular en la literatura que su actividad antioxidante es comparable con la del γ -tocoferol (Galano et al. 2011, *J Phys Chem*, 115 (26): 8590-6). También tiene propiedades anticancerígenas y preventivas contra infecciones inducidas por bacterias como *Helicobacter pylori*, y constituye un captador de radicales alquilperoxilo. También es una molécula de plataforma para la preparación de compuestos de base biológica. Por lo tanto, el canolol es de interés para muchas aplicaciones en diversos campos, tales como alimentos, farmacia, cosméticos o incluso biopolímeros.

45 Recientemente también ha surgido un interés significativo por el 4-vinilguayacol, que tiene aplicaciones en particular como saborizante, agente antioxidante, agente antimicrobiano y agente anticancerígeno. Este compuesto vinilfenólico puede obtenerse en particular por descarboxilación de su precursor el ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico).

50 Sin embargo, actualmente no existe un procedimiento para la producción de canolol o 4-vinilguayacol en cantidades compatibles con un proceso industrial.

En particular, se ha propuesto en la técnica anterior producir canolol a partir de tortas de colza, por vía química, por calor o reacción de descarboxilación inducida por microondas en presencia de una base. Como ejemplo de tal procedimiento, se puede mencionar el procedimiento descrito en la publicación de Pudel et al. (2014, Oilseeds Fats Crops Lipids, 21(1): 103), que implica el calentamiento a alta temperatura de tortas de colza en un lecho fluidizado seguido de extracción con dióxido de carbono supercrítico. Sin embargo, este procedimiento es delicado de implementar, las condiciones de operación tienen que ser reguladas con mucha precisión. Además, es costoso, los rendimientos obtenidos no son satisfactorios y provoca una degradación irreversible de las proteínas en las tortas.

De lo contrario, se ha propuesto en la técnica anterior llevar a cabo la reacción de descarboxilación de ácidos hidroxicinámicos por vía enzimática, por enzimas con actividad de descarboxilasa de ácido fenólico (designado por la abreviatura PAD) de origen bacteriano.

Se pueden citar en particular los trabajos de Hu et al. (2014, Appl Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s00253-014-6313-3), que utilizan una PAD de *Bacillus licheniformis* para la descarboxilación de ácidos hidroxicinámicos como el ácido ferúlico y el ácido cafeico. Esta enzima también tiene una actividad, pero muy débil, de descarboxilación del ácido sinápico.

También fue propuesto por Morley et al. (2013, Green Chem., 15: 3312-3317) llevar a cabo la descarboxilación de ácidos hidroxicinámicos por una enzima derivada por mutagénesis de la PAD de la cepa *Bacillus pumilus* UI-670, conocida por ser capaz de descarboxilar el ácido ferúlico en 4-vinilguayacol, pero es inactivo hacia el ácido sinápico. Esta enzima, llamada SAD por estos autores, hace posible la producción de canolol a partir del ácido sinápico. Sin embargo, su actividad de transformación del ácido ferúlico en 4-vinilguayacol se reduce considerablemente en comparación con la enzima nativa.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de un procedimiento de tipo enzimático/microbiológico, que permita preparar un compuesto vinilfenólico a partir de su precursor ácido hidroxicinámico, que pueda usarse de manera eficaz para todos los principales ácidos hidroxicinámicos que pueden liberarse de las tortas oleaginosas. En términos más generales, sigue existiendo la necesidad de un procedimiento para la producción completamente microbiológica de moléculas vinilfenólicas con alto valor agregado, utilizables en la química verde, a partir de tortas de semillas oleaginosas, un recurso natural abundante y económico.

La presente invención tiene como objetivo proporcionar tales procedimientos.

Los presentes inventores han descubierto ahora que microorganismos particulares, más particularmente hongos filamentosos de la especie *Neolentinus lepideus*, producen enzimas con actividad de descarboxilación de ácidos fenólicos (enzimas PAD, por descarboxilasa del ácido fenólico) que presentan, en forma nativa, sin la necesidad de modificarlos mediante técnicas de bioingeniería, una fuerte actividad de descarboxilación de todos los ácidos hidroxicinámicos presentes en las tortas de semillas oleaginosas, y en particular tanto el ácido sinápico como ácido ferúlico, ácido cafeico o ácido p-cumárico. La biotransformación catalizada por estas enzimas PAD particulares se puede llevar a cabo poniendo en contacto ácido hidroxicinámico con células de *Neolentinus lepideus* cultivadas, así como con la enzima aislada de estas células o con cualquier cepa de un organismo, en particular de un organismo heterólogo, modificado genéticamente para producirlo.

Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto, según la presente invención, se propone un procedimiento de preparación de un compuesto vinilfenólico, en particular un compuesto 4-vinilfenólico, a partir de un ácido hidroxicinámico precursor, en particular un ácido hidroxicinámico derivado de una torta de semillas oleaginosas, como ácido sinápico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico o ácido cafeico. Este procedimiento comprende una etapa de biotransformación del ácido hidroxicinámico al poner en contacto una enzima con la actividad de la descarboxilasa del ácido fenólico (enzima PAD) de un microorganismo de la especie *Neolentinus lepideus*.

Al entrar en contacto con una enzima con actividad de descarboxilasa de ácido fenólico (enzima PAD) de un microorganismo de la especie *Neolentinus lepideus*, la presente invención abarca tanto el contacto del ácido hidroxicinámico con tal enzima PAD aislada de las células que la produjeron, o cuando sea apropiado producida por síntesis química, como el contacto del ácido hidroxicinámico con las células que producen esta enzima en cultivo, en particular las células de la especie *Neolentinus lepideus*, o cualquier otra célula modificada genéticamente para producir dicha enzima.

Neolentinus lepideus es un hongo basidiomiceto filamentoso del género *Neolentinus*, conocido en sí mismo en particular en el sector alimentario.

Como se explicó anteriormente, los presentes inventores han descubierto que la enzima PAD nativa de este hongo de la especie *Neolentinus lepideus* es capaz de convertir el ácido sinápico en canolol con un alto rendimiento, de aproximadamente el 75%, donde los niveles de canolol obtenidos son superiores a 1 g/l, pero también en particular, con un rendimiento igualmente alto, ácido ferúlico como 4-vinilguayacol, ácido p-cumárico como 4-vinilfenol y ácido cafeico en 4-vinilcatecol.

Las enzimas PAD son enzimas intracelulares conocidas en sí mismas, de pequeño tamaño (161 a 178 aminoácidos), activas en forma de dímeros y que no requieren cofactor. El porcentaje de similitud entre los PAD de

origen bacteriano y los PAD de origen fúngico es muy bajo, alrededor del 20%. Solo la región N-terminal de la proteína está relativamente bien conservada.

5 La secuencia de la PAD de una cepa de *Neolentinus lepideus* se publicó recientemente en el portal del DOE Joint Genome Institute (<http://genome.jgi.doe.gov/Neole1/Neole1.home.html>; identificación de la proteína: 1126845, SEQ ID NO: 1). Los presentes inventores han descubierto que esta PAD, como las PAD de las otras cepas de *Neolentinus lepideus*, en la medida en que la secuencia de aminoácidos de la enzima PAD está altamente conservada en la especie *Neolentinus lepideus*, permiten realizar la descarboxilación de todos los ácidos hidroxicinámicos presentes en las tortas de semillas oleaginosas con un rendimiento importante.

10 En realizaciones particulares de la invención, la enzima con actividad de descarboxilasa de ácido fenólico tiene al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95% de identidad de aminoácidos con la secuencia SEQ ID NO: 1.

La enzima con actividad de descarboxilasa de ácido fenólico puede tener, con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1, una o más deleciones, adiciones y/o sustituciones de una o más aminoácidos, que no modifican la actividad de biotransformación de ácidos hidroxicinámicos en compuestos vinilfenólicos.

15 Está dentro de la competencia de un experto en la técnica determinar qué modificaciones se pueden hacer a la secuencia SEQ ID NO: 1, sin alterar significativamente la actividad de biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos, a partir de sus conocimientos teóricos y/o pruebas experimentales.

20 Por ejemplo, dentro del alcance de la invención, las enzimas obtenidas por modificaciones de la secuencia SEQ ID NO: 1 por sustitución de aminoácidos con aminoácidos de la misma familia, por ejemplo, de un residuo básico como la arginina por otro residuo básico como un residuo de lisina, un residuo ácido como el aspartato por otro residuo ácido como el glutamato, un residuo polar como la serina por otro residuo polar como la treonina, un residuo alifático como la leucina por otro residuo alifático como la isoleucina, etc.

En particular, la enzima con actividad descarboxilasa contiene preferiblemente al menos una, preferiblemente más de una, de las siguientes secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5:

SEQ ID NO: 2 - Ser His Glu Gly Ala Thr Ser Glu Glu Phe Lys Gln Ile Glu Gly Lys

SEQ ID NO: 3 - Ile Xaa Ser Gly Pro Xaa Ala Gly Arg

SEQ ID NO: 4 - Val Val Ser Met Val Val Asp Phe Asp Gln Gln Thr Val Lys Thr Phe Ala Thr Phe Ser Arg Gly His Trp Asp Xaa Pro Asp Gln Ala Lys

SEQ ID NO: 5 - Gly Lys Asp Gln Ala Asp Lys His Val Xaa Val Glu His Ala Lys

25 en cada una de las cuales Xaa representa cualquier aminoácido natural.

En particular, en la secuencia SEQ ID NO: 3, los dos residuos Xaa pueden ser idénticos o diferentes.

30 Preferiblemente, en al menos una de las secuencias SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, preferiblemente en dos de estas secuencias, y preferiblemente en todas estas secuencias, Xaa (o al menos uno de los residuos Xaa para la secuencia SEQ ID NO: 3, preferiblemente los dos residuos Xaa) representa un residuo de leucina o un residuo de isoleucina.

Preferiblemente, en al menos una de las secuencias SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, preferiblemente en dos de estas secuencias, y preferiblemente en todas estas secuencias, Xaa (o al menos uno de los residuos Xaa para la secuencia SEQ ID NO: 3, preferiblemente los dos residuos Xaa) es un residuo de isoleucina.

35 La etapa de la biotransformación del ácido hidroxicinámico se puede llevar a cabo en particular mediante el cultivo de células del microorganismo de la especie *Neolentinus lepideus* en presencia del ácido hidroxicinámico precursor por transformar.

40 En particular, se puede utilizar la cepa *Neolentinus lepideus* depositada con el número ATCC 36557 en la American Type Culture Collection (ATCC) o depositada en la colección CIRM-BRFM (International Centre of Microbial Resources-Banque de Ressources Fongiques de Marseille, INRA, Marsella, Francia), bajo el número BRFM 15. Esta cepa es particularmente eficaz para llevar a cabo la biotransformación de ácidos hidroxicinámicos como el ácido sináptico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico y cafeico, en los derivados vinilfenólicos correspondientes. Los rendimientos molares que logra son tan altos como del 70%. La PAD de esta cepa contiene en particular las secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, en las que el residuo Xaa representa un residuo de isoleucina.

45 En realizaciones particulares de la invención, se usa la cepa de *Neolentinus lepideus* HHB14362-Sp depositada en

la colección de Center for Forest Mycology Research Culture Collection (Madison, EE. UU.). La PAD de esta cepa tiene la secuencia SEQ ID NO: 1.

Las células se cultivan en condiciones convencionales en sí mismas, en un medio de cultivo que contiene los componentes necesarios para la supervivencia de las células.

5 La etapa de la biotransformación del ácido hidroxicinámico se puede llevar a cabo reuniendo el ácido hidroxicinámico precursor para transformarlo con la enzima PAD purificada, derivada de una cepa salvaje de *Neolentinus lepideus* o de una producción por un organismo heterólogo, como *Aspergillus niger*, por ejemplo, realizado de manera convencional en sí mismo para el experto en la técnica.

10 La enzima aislada se puede usar en particular en forma inmovilizada sobre soporte sólido. Depende de un experto en la técnica determinar las condiciones operativas apropiadas para garantizar una buena actividad de la enzima.

En realizaciones particulares de la invención, la concentración de ácido hidroxicinámico precursor en el medio de reacción, en particular en el medio de cultivo celular, está comprendida entre 100 y 400 mg/L, preferiblemente entre 300 y 400 mg/L.

15 La etapa de la biotransformación del ácido hidroxicinámico mediante el contacto con la enzima PAD del microorganismo de la especie *Neolentinus lepideus* se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura comprendida entre aproximadamente 37°C y aproximadamente 45°C.

20 Los rendimientos de la reacción también se pueden aumentar separando el compuesto vinilfenólico del medio de reacción, por ejemplo, del medio de cultivo celular, al final de la reacción, a medida que se forma. Esto puede lograrse en particular mediante el uso de resinas capaces de adsorberlo específicamente, pero no adsorber ácidos hidroxicinámicos o absorber poco, por ejemplo, los copolímeros de estireno y divinilbenceno, como las resinas comercializadas bajo los nombres HP20 y XAD2.

Por lo tanto, en realizaciones particulares de la invención, la etapa de biotransformación del ácido hidroxicinámico precursor se lleva a cabo en presencia en el medio de reacción de una resina capaz de adsorber el compuesto vinilfenólico formado a medida que se produce.

25 Dicha característica permite ventajosamente evitar la degradación del compuesto vinilfenólico formado, limitar su posible toxicidad con respecto a los microorganismos fúngicos y aumentar la cantidad de compuesto producido.

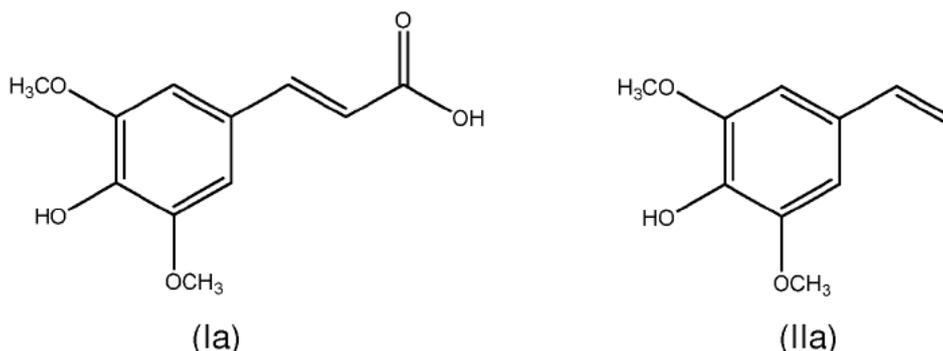
30 En realizaciones particulares de la invención, la etapa de biotransformación del ácido hidroxicinámico precursor se lleva a cabo en un sistema bifásico, más precisamente una mezcla de agua y un disolvente orgánico, como hexano. El disolvente orgánico se elige para no inactivar la enzima PAD. En las realizaciones de la invención en las que la etapa de biotransformación del ácido hidroxicinámico precursor se lleva a cabo poniendo en contacto con células de *Neolentinus lepideus* en cultivo, el disolvente orgánico también se elige para no presentar toxicidad hacia estas células.

Dicha característica permite ventajosamente aumentar el rendimiento de la reacción de biotransformación, mediante la captura del compuesto vinilfenólico por el disolvente orgánico a medida que se forma en el medio de reacción.

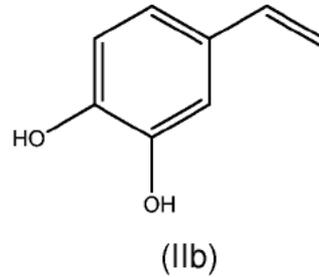
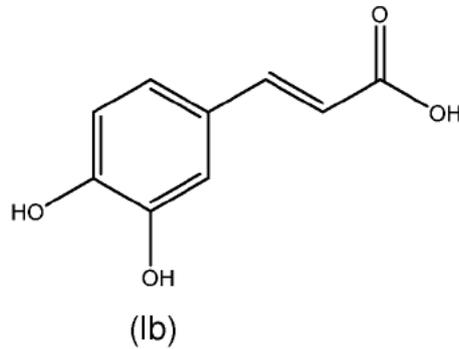
35 El ácido hidroxicinámico precursor se puede llevar en particular al medio de reacción en forma de una solución acuosa. De lo contrario, se puede proporcionar en el medio de reacción en solución en un disolvente orgánico, en particular en un alcohol, por ejemplo, en etanol. Dicha característica permite reducir ventajosamente la cantidad de productos aromáticos secundarios, distintos del vinilfenol, formados durante la reacción de biotransformación.

Según la invención, el ácido hidroxicinámico y el compuesto vinilfenólico pueden consistir, respectivamente, en:

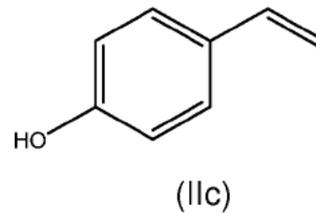
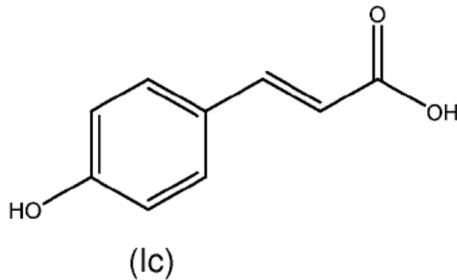
40 - ácido sinápico y canolol, de las fórmulas respectivas (Ia) y (IIa):



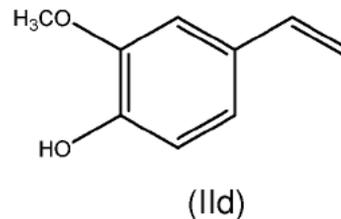
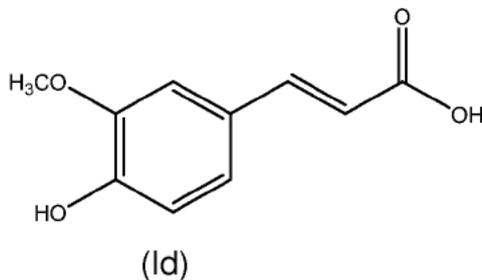
- ácido cafeico y 4-vinilcatecol, de las fórmulas respectivas (Ib) y (IIb):



- ácido p-cumárico y 4-vinilfenol, de las fórmulas respectivas (Ic) y (IIc):



5 - o ácido ferúlico y 4-vinilguayacol, de las fórmulas respectivas (Id) y (IIId):



Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un compuesto vinilfenólico a partir de una torta de semillas oleaginosas, que comprende:

10 - una etapa de liberación, de las tortas de semillas oleaginosas, de un ácido hidroxicinámico precursor del compuesto vinilfenólico,

- y una etapa de transformación del ácido hidroxicinámico así liberado en el compuesto vinilfenólico mediante un procedimiento de preparación según la invención, que cumple una o más de las características anteriores.

Estas dos etapas se pueden separar por una etapa de concentración de ácido hidroxicinámico, por cualquier método que sea convencional en sí mismo para el experto en la técnica.

15 En realizaciones particulares de la invención, la semilla oleaginosa se elige de entre colza, girasol y soja. Las tortas correspondientes, en particular tortas de colza y tortas de girasol, están ventajosamente disponibles en grandes cantidades y a bajo costo.

En la presente descripción, por torta de semillas oleaginosas se entiende la torta propiamente dicha o cualquier fracción de dicha torta.

20 Los ácidos hidroxicinámicos están presentes en forma de éster. Por ejemplo, el ácido sinápico está presente en la torta de colza en forma de sinapina, también llamada éster de colina del ácido sinápico.

La etapa de liberación de ácido hidroxicinámico de las tortas de semillas oleaginosas puede llevarse a cabo por vía química.

De lo contrario, esta etapa de liberación de ácido hidroxicinámico de las tortas de semillas oleaginosas puede llevarse a cabo poniendo en contacto la torta de semillas oleaginosas con una enzima del tipo de cinamoil esterasa, como una feruloil esterasa A (Fae A), una feruloil esterasa B (Fae B), o una clorogenato esterasa (Chlo E), de un microorganismo de la especie *Aspergillus niger*, en condiciones que permitan la liberación de ácido hidroxicinámico de las tortas de semillas oleaginosas. Está dentro de la competencia de un experto en la técnica determinar estas condiciones, en función de la enzima particular utilizada.

Por ejemplo, en particular, cuando la torta de semillas oleaginosas es una torta de colza, el ácido hidroxicinámico es ácido sinápico, y la etapa de liberación de este ácido sinápico se lleva a cabo uniendo la torta de colza con la enzima FaeA, la reunión de la torta de semillas oleaginosas con la enzima se lleva a cabo de acuerdo con al menos una, preferiblemente varias, de las siguientes condiciones: temperatura comprendida entre 45 y 55°C, tiempo de reunión de al menos 3 horas, y cantidad de enzima tipo cinamoil esterasa comprendida entre 26 y 40 nkat por gramo de torta. Tales condiciones permiten obtener ventajosamente los mejores rendimientos para la liberación de ácido hidroxicinámico de la torta de semillas oleaginosas.

La etapa de liberación del ácido hidroxicinámico de la torta de semillas oleaginosas se puede llevar a cabo en particular poniendo en contacto la torta con una enzima de tipo cinamoil esterasa purificada, derivada de una cepa salvaje de *Aspergillus niger* o de una producción de otro organismo heterólogo, realizada convencionalmente en sí misma para el experto en la técnica; o una mezcla de tales enzimas purificadas.

En realizaciones particulares de la invención, la etapa de liberación del ácido hidroxicinámico puede llevarse a cabo de otro modo reuniendo la torta de semillas oleaginosas con una preparación enzimática obtenida del sobrenadante de un cultivo de células del microorganismo de la especie *Aspergillus niger* en presencia de un sustrato natural seleccionado de entre las tortas de semillas oleaginosas y la pulpa de remolacha azucarera.

En particular, los presentes inventores han descubierto que es posible, a partir de cultivos de *Aspergillus niger* realizados adecuadamente en sustratos inductores naturales apropiados, más particularmente tortas de semillas oleaginosas o pulpa de remolacha azucarera, para obtener una preparación enzimática que tiene un espectro de actividades enzimáticas necesarias para la liberación de ácido hidroxicinámico, en particular ácido sinápico, a partir de tortas de semillas oleaginosas.

El sustrato natural utilizado, que desempeña el papel de fuente de carbono natural e inductor enzimático, puede elegirse en particular para permitir la producción mayoritaria, por el microorganismo de la especie *Aspergillus niger*, de una enzima particular de tipo cinamoil esterasa entre todas las enzimas de tipo cinamoil esterasa capaces de producirse, y en particular de la enzima que tiene la mayor actividad para lograr la liberación del ácido hidroxicinámico particular diana.

Por ejemplo, cultivadas en presencia de una torta de colza como sustrato de carbono natural, las células de la especie *Aspergillus niger* producirán principalmente, en el sobrenadante del cultivo, feruloil esterasa A (Fae A), que es particularmente activa, por ejemplo, para la liberación de ácido sinápico de la torta de colza, mientras se cultiva en presencia de torta de girasol, las células de la especie *Aspergillus niger* producirán principalmente feruloil esterasa B (Fae B).

El sobrenadante del cultivo celular del microorganismo de la especie *Aspergillus niger* en presencia del sustrato natural puede tomarse en particular después de al menos 4 días, con preferencia, después de aproximadamente 10 días, de cultivo celular.

La preparación enzimática, resultante del sobrenadante del cultivo celular del microorganismo de la especie *Aspergillus niger* en presencia de un sustrato natural, también puede consistir en este sobrenadante en sí mismo, como en un concentrado de este sobrenadante, obtenido por ejemplo por ultrafiltración o por liofilización, o una fracción de este sobrenadante.

En realizaciones particulares de la invención, para la etapa de liberación del ácido hidroxicinámico de tortas de semillas oleaginosas, se utiliza una preparación enzimática producida por la cepa CNCM I-1472 de *Aspergillus niger* (depositada el 31 de agosto de 1994 en la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes, París, Francia; y también depositada en la colección CIRM-BRFM (International Centre of Microbial Resources-Banque de Ressources Fongiques de Marseille, INRA, Marsella, Francia) bajo el número BRFM 281).

En presencia de sustratos naturales inductores como la torta de colza o la torta de girasol, la cepa de *A. niger* BRFM 281 es capaz de producir las cinamoil esterases: feruloil esterasa A (Fae A), feruloil esterasa B (Fae B) y/o clorogenato esterasa (Chlo E). Estas enzimas permiten la hidrólisis de los ésteres de los ácidos cinámicos.

El procedimiento para producir un compuesto vinilfenólico a partir de una torta de semillas oleaginosas, de acuerdo con la presente invención, usando una preparación enzimática para la etapa de liberación de ácido hidroxicinámico de las tortas de semillas oleaginosas, tiene en particular la ventaja de ser completamente de naturaleza

biotecnológica y de no utilizar ningún reactivo químico.

Las características y ventajas de los métodos de acuerdo con la invención aparecerán más claramente a la luz de los ejemplos de implementación a continuación, proporcionados solo con fines ilustrativos y de ninguna manera limitativos de la invención, con el apoyo de las figuras 1 a 13, en las que:

- 5 - la figura 1 representa un gráfico que ilustra la cantidad de ácido sinápico liberado de la torta de colza según la invención, mediante un proceso que usa una preparación enzimática obtenida por cultivo de la cepa *Aspergillus niger* BRFM 281 en (a) torta de colza, (b) torta de girasol, (c) pulpa de remolacha azucarera, para diferentes tiempos de incubación de la torta de colza con dicha preparación enzimática: 0, 4 y 21 h; donde el control corresponde a la hidrólisis alcalina de la torta de colza;
- 10 - la figura 2 representa un gráfico que ilustra la cantidad de ácido sinápico liberado de la torta de colza según la invención, después de diferentes tiempos de incubación, mediante un procedimiento que usa la enzima Chlo E pura, la enzima Fae A pura, una preparación enzimática obtenida por cultivo de la cepa *Aspergillus niger* BRFM 281 en torta de girasol (SFM), o una preparación enzimática obtenida por cultivo de la cepa *Aspergillus niger* BRFM 281 en torta de colza (RSM); donde el control corresponde a una reacción en el regulador en ausencia de enzima;
- 15 - la figura 3 representa un gráfico que ilustra, en función del tiempo de incubación, la cantidad de sinapina liberada para una torta de colza puesta en contacto, de acuerdo con la invención, con la enzima Chlo E pura, la enzima Fae A pura, una preparación enzimática obtenida por cultivo de la cepa *Aspergillus niger* BRFM 281 en torta de girasol (SFM), o una preparación enzimática obtenida por cultivo de la cepa *Aspergillus niger* BRFM 281 en torta de colza (RSM); donde el control corresponde a una reacción en el regulador en ausencia de enzima;
- 20 - la figura 4 representa un gráfico que muestra las concentraciones de ácido sinápico (SA) restante y consumido, y de canolol formado, en el medio de cultivo de la cepa *N. leptideus* BRFM 15 suplementado con ácido sinápico durante la implementación de un procedimiento de acuerdo con la invención para la biotransformación de ácido sinápico en canolol; las concentraciones de ácido siríngico (SGA) y siringaldehído (SGAL) formados en el medio de cultivo también se indican en el gráfico;
- 25 - la figura 5 representa un gráfico que muestra las concentraciones de ácido ferúlico (FA) restante y consumido, y de 4-vinilguayacol formado, en el medio de cultivo de la cepa *N. leptideus* BRFM 15 suplementado con ácido ferúlico durante la implementación de un procedimiento de acuerdo con la invención para la biotransformación de ácido ferúlico en 4-vinilguayacol (4-VG);
- 30 - la figura 6 representa un gráfico que muestra las concentraciones de canolol formado, en los medios de cultivo respectivamente de la cepa *N. leptideus* BRFM 15 y de la cepa *N. leptideus* HHB14362-Sp, suplementados con ácido sinápico durante la implementación de un procedimiento de acuerdo con la invención para la biotransformación de ácido sinápico en canolol; las concentraciones de ácido siríngico (SGA) formado en el medio de cultivo también se indican en el gráfico;
- 35 - la figura 7 representa un gráfico que muestra las concentraciones de 4-vinilguayacol (4-VGA) formado, en los medios de cultivo de la cepa *N. leptideus* BRFM 15 y de la cepa *N. leptideus* HHB14362-Sp, respectivamente, suplementados con ácido ferúlico durante la implementación de un procedimiento de acuerdo con la invención para la biotransformación de ácido ferúlico en 4-vinilguayacol; las concentraciones de ácido vanílico (VA) formado en el medio de cultivo también se indican en el gráfico;
- 40 - la figura 8 representa un gráfico que muestra las concentraciones de 4-vinilfenol (4-VP) formado, en los medios de cultivo, respectivamente, de la cepa *N. leptideus* BRFM 15 y de la cepa *N. leptideus* HHB14362-Sp, suplementados con ácido p-cumárico durante la implementación de un procedimiento de acuerdo con la invención para la biotransformación de ácido p-cumárico en 4-vinilfenol;
- 45 - la figura 9 representa un gráfico que muestra las concentraciones de 4-vinilguayacol (4-VGA) formado, en los medios de cultivo, respectivamente, de la cepa *N. leptideus* BRFM 15, de la cepa *S. commune* BRFM 823 y de la cepa *S. hirsutum* BRFM 889, suplementados con ácido ferúlico durante la implementación de un procedimiento de acuerdo con la invención para la biotransformación de ácido ferúlico en 4-vinilguayacol;
- 50 - la figura 10 representa un gráfico que muestra las concentraciones de canolol formado, en los medios de cultivo de la cepa *N. leptideus* BRFM 15, de la cepa *N. leptideus* HHB14362-Sp, de la cepa *S. commune* BRFM 823 y de la cepa *S. hirsutum* BRFM 889, respectivamente, suplementados con ácido sinápico durante la implementación de un procedimiento de acuerdo con la invención para la biotransformación de ácido sinápico en canolol;
- 55 - la figura 11 representa gráficos que muestran el % de ácido sinápico (AS) liberado en el medio de reacción a partir de la torta de colza según la invención, por medio de la enzima FaeA de *Aspergillus niger*, en función del tiempo de incubación con la enzima, expresándose este porcentaje en g de AS por 100 g de torta inicial (materia seca), a diferentes concentraciones de enzima en el medio de reacción (30,5, 131 o 196 nkat), a temperaturas de (a) 37°C, (b) 45°C, (c) 55°C; donde el control negativo corresponde al medio sin enzima;

- la figura 12 representa gráficos que muestran la concentración de vinilguayacol o canolol ([producto]) obtenido en función del tiempo de incubación de los ácidos hidroxicinámicos (ácido sinápico AS o ácido ferúlico AF) con un extracto intracelular bruto (CE) de la cepa *N. lepidus* BRFM 15 según la invención, para diferentes volúmenes de extracto intracelular EC utilizado (1 ml, 3 ml), y a temperaturas: (a) 30°C, (b) 37°C;

5 - y la figura 13 representa un gráfico que muestra las concentraciones de canolol y ácido siríngico (SGA) obtenidos en función del tiempo de incubación del ácido sinápico (AS) con células de la cepa *N. lepidus* BRFM 15 de acuerdo con invención, en condiciones en las que el ácido sinápico es de origen natural (resultante de la hidrólisis de la torta de colza por la enzima Fae A según la invención) o comercial, y está aportado en solución acuosa o etanólica; en esta figura, los símbolos sólidos representan el canolol y los símbolos vacíos representan el ácido siríngico (SGA).

10 A/ Materiales y métodos

Material vegetal

Las tortas de colza y de girasol fueron suministradas por el Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux et du Chanvre (CETIOM, Pessac, Francia, ahora conocido como Terres Inovia). Antes de su uso como sustrato de crecimiento fúngico, las tortas se molieron para obtener partículas de un tamaño comprendido entre 0,18 y 0,8 mm.

15 Se usaron dos lotes diferentes de cada uno de los tipos de torta, que varían en origen geográfico y modo de molienda, y se nombraron de la siguiente manera: SFM1 y SFM3 para las tortas de girasol; RSM2 y RSM4 para tortas de colza. SFM1 y RSM2 se obtuvieron a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 50 ± 5 min; SFM3 y RSM4 se obtuvieron a $107 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 80 ± 5 min.

Productos químicos

20 Todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Microorganismos y condiciones de cultivo.

25 Las cepas *N. lepidus* ATCC 36557 (BRFM 15) y *Aspergillus niger* I-1472 (BRFM 281) estudiadas se depositaron en la colección CIRM-BRFM (International Centre of Microbial Resources-Banque de Ressources Fongiques de Marseille, INRA, Marsella, Francia). La cepa *N. lepidus* HHB14362-Sp. fue depositada en la colección del Center for Forest Mycology Research Culture Collection (Madison, EE. UU.).

Estas cepas se almacenan en un agar inclinado a 4°C.

30 Para las pruebas de bioconversión de ácido hidroxicinámico en compuestos vinilfenólicos, la cepa *N. lepidus* (BRFM 15 o HHB14362-Sp.) se cultivó en el siguiente medio de precultivo y cultivo: glucosa (20 g.l^{-1}), extracto de levadura ($0,5 \text{ g.l}^{-1}$), tartrato de diamonio ($1,84 \text{ g.l}^{-1}$), KH_2PO_4 ($0,2 \text{ g.l}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,00132 \text{ g.l}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ g.l}^{-1}$) y clorhidrato de tiamina ($0,0025 \text{ g.l}^{-1}$). El inóculo se preparó a partir de precultivos de 10 días a 30°C en viales Roux que contenían 180 mL de medio.

35 Los cultivos se llevaron a cabo a 30°C y 120 rpm en matraces Erlenmeyer graduados de 250 mL que contenían 100 mL de medio. Después de 3 días de incubación, se agregó ácido sinápico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico o ácido cafeico (precursor fenólico) en forma de una solución esterilizada por filtración, a una concentración final determinada, por ejemplo, $0,3 \text{ g.l}^{-1}$.

40 La alimentación del precursor fenólico se llevó a cabo diariamente para mantener la concentración final determinada, por ejemplo $0,3 \text{ g.l}^{-1}$, en el medio de cultivo. En el caso de cultivos realizados en presencia de una resina adsorbente HP20, el adsorbente (100 g.l^{-1}) se añadió directamente en forma de partículas libres el día 4 de cultivo. Luego, en los días 7, 10 y 14 de cultivo, el medio de cultivo y la resina se retiraron de los matraces y se separaron por filtración. Los metabolitos adsorbidos en la resina se extrajeron dos veces con etanol puro, agitando durante 2 ha 200-300 rpm con un agitador magnético, y se analizaron por HPLC, junto con los compuestos que permanecen en el medio de cultivo.

Métodos analíticos

45 El contenido de materia seca de las tortas se produjo mediante secado hasta que se obtuvo una masa constante a 110°C.

50 El análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizó a 220 nm y 30°C en un modelo Agilent 1100 equipado con un detector UV/Vis variable y un inyector automático. Las separaciones se llevaron a cabo en una columna de fase inversa C30 (carotenoide YMC® 3 μm , 4,6 x 150 mm, Waters, a un caudal de $0,8 \text{ ml.min}^{-1}$, con fases móviles: ácido fosfórico al 0,05% en agua (disolvente A) y acetonitrilo al 100% (disolvente B). El gradiente se ajustó de la siguiente manera: disolvente B al 15% durante 5 minutos, aumentado al 40% en 15 minutos, luego hasta el 100% en 5 minutos hasta el final (28 minutos). Los datos fueron procesados por Agilent 1100 ChemStation, y la cuantificación se realizó mediante calibración estándar externa.

B/ Producción de canolol

B.1/ Liberación de ácido sinápico de la torta de colza por un caldo de cultivo de *Aspergillus niger*

5 Los cultivos se llevan a cabo en matraces Erlenmeyer graduados de 500 ml, con 100 mL de medio que contiene, por litro: 1,842 g de tartrato de diamonio como fuente de nitrógeno, 0,5 g de extracto de levadura, 0,2 g de KH_2PO_4 , 0,0132 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Los sustratos naturales, torta de colza, torta de girasol o pulpa de remolacha azucarera (fracción 0,18-0,8 mm) a una concentración de 15 g/l se utilizan como fuente de carbono natural e inductor enzimático. Se usan 2,5 g/l de maltosa como activador del crecimiento. Los cultivos se inoculan con $2 \cdot 10^5$ conidiosporas de *A. niger* por ml. Los cultivos se llevan a cabo a 30°C y 105 rpm.

Análisis de la actividad de las enzimas presentes en el caldo de cultivo

10 El seguimiento de la actividad de las enzimas Fae A, Fae B y Chlo E se sigue durante 11 días (D1 a D11) de incubación a 30°C y 105 rpm.

15 El ensayo de las actividades enzimáticas se lleva a cabo de manera convencional en sí mismo, utilizando como sustrato metil sinapato para la enzima Fae A, metil cumarato para la enzima Fae B y ácido clorogénico para la enzima Chlo E, de acuerdo con los protocolos operativos descritos en las publicaciones de Benoit et al. 2007, *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5624-5632; y Record et al. 2003, *Applied Microbiology and Biotechnology* 62: 349-355.

En presencia de RSM4 como sustrato inductor en el medio de cultivo, la cepa de *A. niger* BRFM 281 produce principalmente Fae A, con un pico de actividad en el día D10 (0,67 nkat/ml). En menor medida, también se produce Fae B (máximo 0,44 nkat/ml en el día D10) y Chlo E (máximo 0,30 nkat/ml en el día D10).

20 En presencia de SFM1 como sustrato inductor en el medio de cultivo, la cepa de *A. niger* BRFM 281 produce principalmente Fae B, con un pico de actividad en el día D10 (0,75 nkat/ml). En menor medida, también se produce Fae A (máximo 0,32 nkat/ml en el día D5) y Chlo E (máximo 0,24 nkat/ml en el día D8).

Liberación de ácido sinápico

25 Después de 4 días de incubación a 30°C y 105 rpm, el micelio se elimina por filtración y el sobrenadante se filtra a través de unidades de filtración de 0,22 µm.

30 A continuación, el sobrenadante, es decir, el caldo de cultivo desprovisto de células que contienen las enzimas hidrolíticas (preparación enzimática), se utiliza para liberar el ácido sinápico de las tortas de colza, de la siguiente manera: 100 mL de sobrenadante se incuban a 30°C y 115 rpm con 5 g de torta de colza RSM4 (fracción 0,18-0,8 mm). La liberación de ácido sinápico de la torta se mide por análisis de HPLC, de acuerdo con el método indicado anteriormente, después de 0, 4 y 21 h de incubación, respectivamente.

La cantidad de ácido sinápico liberado para cada una de las condiciones de funcionamiento se muestra en la figura 1. En esta figura, la referencia corresponde a la cantidad obtenida por hidrólisis alcalina de tortas de colza, y es indicativa de la cantidad inicial de ácido sinápico en las tortas de colza.

35 Como se puede ver, el ácido sinápico se libera en el sobrenadante del cultivo, independientemente de la preparación enzimática utilizada. El mejor resultado se obtiene para el caldo de cultivo de la cepa *Aspergillus niger* en torta de colza, después de 4 h de incubación: se obtienen 0,47 g de ácido sinápico por 100 g de torta de colza. Esto corresponde al 78% del contenido inicial de ácido sinápico en la torta (referencia: cantidad medida a 0,6 g por 100 g de torta).

Después de esta etapa, el ácido sinápico se separa del sobrenadante del cultivo.

40 B.2/ Liberación de ácido sinápico de las tortas de colza por caldos de cultivo de *Aspergillus niger* o enzimas puras Fae A o Chlo E

100 mL de sobrenadante de un cultivo de cepa *A. niger* BRFM 281 realizado en presencia de 15 g/L de RSM4 o SFM1 (todas las fracciones), de acuerdo con las condiciones descritas en el punto B.1/ anterior, se recuperan después de 4 días de incubación.

45 Estos sobrenadantes contienen: 30,5 nkat de Fae A, 26,1 nkat de Fae B y 18,2 nkat de Chlo E para el cultivo realizado en presencia de RSM4; y 13,5 nkat de Fae A, 35,6 nkat de Fae B y 11,4 nkat de Chlo E para el cultivo realizado en presencia de SFM1.

Cada uno de estos sobrenadantes se incuban a 37°C y 150 rpm con 5 g de torta de colza RSM4 (todas las fracciones).

50 Alternativamente, se incuban 100 mL de regulador MOPS 100 mM pH 5,5 que contiene 30,5 nkat de Fae A puro o 18 nkat de Chlo E puro a 37°C y 150 rpm con 5 g de torta de colza RSM4 (todas las fracciones).

El control consiste en 100 mL de regulador MOPS 100 mM pH 5,5 sin enzimas e incubado a 37°C, 150 rpm con 5 g de torta de colza RSM4.

La liberación de ácido sinápico y la desaparición de sinapina se miden por análisis de HPLC, de acuerdo con el método indicado anteriormente, después de 0, 2 y 4 horas de incubación, respectivamente.

5 La cantidad de ácido sinápico liberado para cada una de las condiciones de funcionamiento se muestra en la figura 2. Como se puede observar, el ácido sinápico se libera después de 2 horas en presencia de las preparaciones enzimáticas de la cepa *A. niger* BRFM 281, o en presencia de Fae A puro. El mejor resultado se obtiene para Fae A puro después de 4 horas de incubación: se obtienen 0,50 g de ácido sinápico por 100 g de torta de colza. Los caldos de cultivo de *A. niger* obtenidos de acuerdo con la invención también hace posible liberar una cantidad importante de ácido sinápico de las tortas de colza.

La cantidad de sinapina liberada para cada una de las condiciones operativas se muestra en la figura 3. De allí se deduce que la liberación de ácido sinápico es concomitante con la desaparición de la sinapina, que se hidroliza casi instantáneamente después de su liberación de la torta, y cualquiera que sea la preparación enzimática utilizada, excepto la enzima Chlo E.

15 B.3/ Biotransformación de ácido sinápico en canolol

Este experimento se lleva a cabo utilizando ácido sinápico comercial.

Se agrega ácido sinápico (SA) a los cultivos de 3 días de *N. lepidus* BRFM 15 y luego se agrega diariamente para mantener una concentración final de 300 a 400 mg.l⁻¹ en el medio de cultivo.

20 El principal compuesto formado detectado en el medio de cultivo es el canolol, que se confirma por espectrometría de masa.

La concentración de cada uno de los compuestos aromáticos ácido sinápico y canolol presentes en el medio de cultivo se evalúa en función del tiempo de incubación. Los resultados se muestran en la figura 4.

25 La producción de canolol comenzó en el cuarto día de cultivo para alcanzar la concentración máxima de 1,123 g.l⁻¹ en el día 11 con una productividad de 102 mg.l⁻¹.día⁻¹ y un rendimiento molar del 75%. Durante la biotransformación del ácido sinápico en canolol, se han detectado otros compuestos fenólicos formados en pequeñas cantidades: ácido siríngico (SGA) y siríngaldehído (SGAL).

B.4/ Biotransformación en canolol de ácido sinápico natural resultante de la hidrólisis de la torta de colza por *N. lepidus* BRFM 15

30 Este experimento se lleva a cabo con ácido sinápico natural obtenido de la hidrólisis de la torta de colza. Comprende dos etapas:

- la hidrólisis de las formas esterificadas de ácido sinápico presente en la torta de colza por Fae A, seguido de la recuperación de ácido sinápico en una resina selectiva y su elución por un disolvente "verde" evaporable fácilmente a baja temperatura,

- la bioconversión de este ácido sinápico natural en canolol gracias a un cultivo de *N. lepidus* BRFM 15.

35 En la primera etapa, se incubaron 814 g (materia seca) de torta de colza con 35057 nkat de FaeA (es decir, 39 nkat FaeA por gramo de torta) en 7 l de regulador MOPS 100 mM pH 5, a 55°C durante 1 a 4h30 (preferiblemente 1h30) con agitación a 500 rpm. Al final de esta etapa, se liberan 5,1 g de ácido sinápico por hidrólisis de la torta, es decir, un rendimiento de hidrólisis del 85-90%.

40 La torta residual se separa del sobrenadante de hidrólisis enzimática, cuyo pH se ajusta a 4. Este último se incuba con un adsorbente hidrófobo específico del tipo de estireno o copolímero de estireno y divinilbenceno (resina Amberlite® XAD2 o XAD1180) para recuperar específicamente ácido sinápico, a una velocidad de 10 a 125 g de resina, preferiblemente de 30 a 100 g, por litro de sobrenadante. El tiempo de incubación es de 2 a 18 h, preferiblemente de 2 a 4 h, a una temperatura de 30°C, con agitación orbital de 160 rpm. La elución del ácido sinápico se lleva a cabo utilizando etanol, a razón de 1 a 100 mL de etanol, preferiblemente de 10 a 50 ml, por gramo de resina.

Al final de esta etapa, se recuperan 4,13 g de ácido sinápico, es decir, un rendimiento del 81% en comparación con la cantidad de ácido sinápico contenida en la torta. El etanol se evapora al vacío a 30°C para obtener una solución etanólica de ácido sinápico natural con una concentración de 25 g.l⁻¹.

50 En la segunda etapa, esta solución de ácido sinápico natural se agrega a cultivos de 3 días de *N. lepidus* BRFM 15 y luego se agrega diariamente para mantener una concentración final de 300 a 400 mg.l⁻¹ de ácido sinápico en el medio de cultivo. La concentración de cada uno de los compuestos aromáticos formados, ácido siríngico y canolol, presentes en el medio de cultivo, se evalúa en función del tiempo de incubación.

A título comparativo, el mismo experimento se lleva a cabo utilizando ácido sinápico comercial, en solución acuosa o en solución etanólica, a la misma concentración.

Los resultados se muestran en la figura 13.

5 La producción de canolol comenzó en el cuarto día de cultivo para alcanzar la concentración máxima de 1,277 g.l⁻¹ en el día 13 con una productividad de 100 mg.l⁻¹.día⁻¹ y un rendimiento molar del 80%.

Se observa, además, que la contribución del ácido sinápico natural en forma de una solución etanólica permite reducir en un factor 1,6 a 2 la producción de ácido siríngico, en los primeros días de cultivo, en comparación con una biotransformación realizada con ácido sinápico disuelto en agua.

C/ Biotransformación de ácido ferúlico en 4-vinilguayacol

10 Se agrega ácido ferúlico (FA) a los cultivos de 3 días de *N. lepidus* BRFM 15 y luego se agrega diariamente para mantener una concentración final de 300 a 400 mg.l⁻¹ en el medio de cultivo.

El principal compuesto detectado en el medio de cultivo es 4-VG (4-vinilguayacol), que se confirma por espectrometría de masa. Se llevan a cabo varias pruebas y las concentraciones finales de 4-VG varían de 1,1 a 1,85 g.l⁻¹, que es el umbral de solubilidad máxima para 4-VG en la fase acuosa.

15 La concentración de cada uno de los compuestos aromáticos, ácido ferúlico y 4-VG, presentes en el medio de cultivo, se evalúa en función del tiempo de incubación. Los resultados se muestran en la figura 5.

Por ejemplo, se produjeron 1,433 g.l⁻¹ de 4-VG en 16 días de cultivo. La producción de 4-VG comenzó el cuarto día de cultivo y la productividad máxima (95 mg.l⁻¹.día⁻¹) alcanzó el día 14. El rendimiento molar fue aproximadamente del 100%.

20 D/ Biotransformación de ácido cafeico en 4-vinilcatecol

Se agrega ácido cafeico a los cultivos de 3 días de *N. lepidus* BRFM 15 y luego se agrega diariamente para mantener una concentración final de 300 a 400 mg.l⁻¹ en el medio de cultivo.

El principal compuesto detectado en el medio de cultivo es el 4-vinilcatecol, que se confirma por espectrometría de masa.

25 E/ Biotransformación de ácido ferúlico en presencia de resina adsorbente

Primer experimento

La biotransformación del ácido ferúlico (FA) en 4-VG se lleva a cabo mediante un procedimiento de acuerdo con la invención que usa la resina adsorbente HP20 (copolímero de estireno y divinilbenceno, comercializado por Mitsubishi).

30 La concentración de FA se mantiene diariamente a 300 mg.l⁻¹ mediante la suplementación adecuada durante 14 días de cultivo. El adsorbente (100 g.l⁻¹) se agrega directamente en forma de partículas libres el día 4 de cultivo. Luego, en los días 7, 10 y 14 de cultivo, el medio de cultivo y la resina se retiran de los matraces y se separan por filtración. Los metabolitos adsorbidos en la resina se extraen dos veces con etanol puro, agitando durante 2 horas a 200-300 rpm a 30°C.

35 Los rendimientos de 4-VG se evalúan en ausencia y en presencia de resina HP20. En ausencia de resina, el rendimiento molar de la bioconversión de FA en 4-VG es del 71% (0,7 g.l⁻¹, es decir 4,6 mmol.l⁻¹ de 4-VG producido para 6,5 mmol.l⁻¹ de FA consumido). En presencia de resina HP20, el rendimiento molar aumenta al 82% con un aumento de 2,2 veces en la cantidad de 4-VG producida (1,57 g.l⁻¹, es decir, 10,4 mmol.l⁻¹ de 4-VG). Solo el 13% del total de FA agregado se adsorbió en la resina.

40 Segundo experimento

En este experimento, se utiliza la resina adsorbente XAD2 (copolímero de estireno y divinilbenceno).

45 Después de 5 días de cultivo en las condiciones indicadas en el primer experimento anterior (4,6 l de cultivo), se agrega resina XAD2 al medio de cultivo a una velocidad de 100 g/L. El 4-vinilguayacol se adsorbe en la resina a medida que se produce en el medio de cultivo. Después de 13 días de cultivo, la resina se separa del medio y el 4-vinilguayacol se eluye con metanol (o etanol), para obtener 200 mL de solución alcohólica concentrada que contiene 8,9 g de 4-vinilguayacol para una pureza del 99%. El rendimiento molar es del 70%.

F/ Biotransformación de ácido sinápico en presencia de resina adsorbente

La biotransformación del ácido sinápico (SA) en canolol se lleva a cabo mediante un procedimiento de acuerdo con la invención que utiliza la resina adsorbente XAD2 (copolímero de estireno y divinilbenceno).

La concentración de ácido sinápico se mantiene diariamente a 300 mg.l⁻¹ mediante la suplementación adecuada durante 14 días de cultivo.

Después de 13 días de cultivo, el sobrenadante (4,2 L) se separa del micelio, se ajusta a pH 7 y se agrega a 420 g de resina XAD2. Después de la adsorción sobre la resina, el canolol se eluye con metanol, para obtener 200 mL de solución alcohólica concentrada que contiene 2,2 g de canolol con una pureza del 70%. El rendimiento molar es del 70%.

G/ Biotransformación de ácidos hidroxicinámicos por diferentes cepas de *Neolentinus lepideus* y otros hongos

G.1/ Experimento 1

Este experimento se lleva a cabo en las condiciones operativas descritas en el punto B.3/ anterior, con la diferencia de que se usa una concentración de ácido hidroxicinámico de 150 mg/L en lugar de 300 mg/L.

Las cepas de *N. lepideus* utilizadas son la cepa BRFM 15 y la cepa HHB14362-Sp.

Las dos cepas *N. lepideus* BRFM 15 y *N. lepideus* HHB14362-Sp se cultivan en presencia de ácido sinápico, ácido ferúlico o ácido p-cumárico como precursores, respectivamente, de canolol, de 4-vinilguayacol y 4-vinilfenol. En este experimento, cada precursor se agrega desde el tercer día de cultivo y para mantener una concentración de 150 mg/L en el medio de cultivo. Las concentraciones de cada uno de los compuestos aromáticos presentes en el medio de cultivo se evalúan en función de los tiempos de incubación de las dos cepas analizadas. Los resultados se muestran en las figuras 6, 7 y 8, respectivamente, para la biotransformación de ácido sinápico, ácido ferúlico y ácido p-cumárico.

Las siguientes observaciones aparecen de estas figuras.

La producción de canolol comenzó en el cuarto día de cultivo para alcanzar la concentración máxima de 420 mg/L en el día D11 con un rendimiento molar del 45% para la cepa BRFM 15, y 319 mg/L en el día D11 con un 46% de rendimiento molar para la cepa HHB14362-Sp.

La producción de 4-vinilguayacol comenzó el cuarto día de cultivo para alcanzar la concentración máxima de 782 mg/L en el día D13 con un rendimiento molar del 49% para la cepa BRFM 15, y 609 mg/L en el día D14 con un rendimiento molar del 34% para la cepa HHB14362-Sp.

La producción de 4-vinilfenol comenzó el cuarto día de cultivo para alcanzar la concentración máxima de 340 mg/L en el día D10 con un rendimiento molar del 35% para la cepa BRFM 15 y 180 mg/L en el día D10 con un rendimiento molar del 21% para la cepa HHB14362-Sp.

Por lo tanto, las dos cepas de *N. lepideus* transforman eficientemente los tres compuestos probados.

G.2/ Experimento

Este experimento se lleva a cabo en las condiciones operativas descritas en el punto B.3/ anterior, para los ácidos hidroxicinámicos que son ácido ferúlico y ácido sinápico.

Las cepas de *N. lepideus* utilizadas son la cepa BRFM 15 y la cepa HHB14362-Sp descritas anteriormente, así como las dos cepas siguientes, pertenecientes al subgrupo de hongos Agaricomycotina del grupo Basidiomycota:

- cepa de la especie *Schizophyllum commune*, depositada en la colección CIRM-BRFM con el número de acceso BRFM 823,

- cepa de la especie *Stereum hirsutum*, depositada en la colección CIRM-BRFM con el número de acceso BRFM 889.

Estas especies han sido anotadas en el sitio JGI (Joint Genome Institute) por tener PAD putativas.

Las cuatro cepas se cultivan en presencia de ácido sinápico o ácido ferúlico como precursores, respectivamente, canolol y 4-vinilguayacol. En este experimento, cada precursor se agrega desde el tercer día de cultivo y para mantener una concentración de 300 mg/L en el medio de cultivo, con la excepción de las cepas que son *S. commune* BRFM 823 y *S. hirsutum* BRFM 889, cuando el precursor es el ácido sinápico: la concentración de ácido sinápico en el medio de cultivo se mantiene en 150 mg/L.

Las concentraciones de cada uno de los compuestos formados en el medio de cultivo (4-vinilguayacol y canolol) se evalúan en función de los tiempos de incubación de las cuatro cepas analizadas. Los resultados se muestran en las figuras 9 y 10, respectivamente, para la biotransformación de ácido ferúlico y ácido sinápico.

Las siguientes observaciones aparecen de estas figuras.

Las cepas de *S. commune* y *S. hirsutum* son capaces de llevar a cabo la biotransformación del ácido ferúlico en 4-

vinilguayacol (4-VG), pero nada de ácido sinápico en canolol.

5 La producción de 4-VG comienza el cuarto día de cultivo, para alcanzar: 1,45 g/L el día D14 (productividad 103 mg/L.d), con un rendimiento molar del 87% para la cepa *N. lepideus* BRFM 15; 1,03 g/L el día D15 (productividad 69 mg/L.d), con un rendimiento molar del 71% para la cepa de *S. commune* BRFM 823; y 69 mg/L en el día D16 (productividad 13 mg/L.d), con un rendimiento molar del 60% para la cepa *S. hirsutum* BRFM 889. En todos los casos, las cantidades y los rendimientos obtenidos en 4-VG permanecen más bajos, para las cepas de *S. commune* y *S. hirsutum*, a las obtenidas con las cepas de *N. lepideus*.

Por lo tanto, las enzimas PAD de *S. commune* y *S. hirsutum* son diferentes de las de *N. lepideus*, y tienen una afinidad por el ácido ferúlico, pero no por el ácido sináptico, como las PAD bacterianas.

10 Además, con respecto a las dos cepas de *N. lepideus*, se puede ver que los rendimientos de producción de canolol permanecen más bajos, para la cepa *N. lepideus* HHB14362-sp, que para la cepa BRFM 15. Por lo tanto, la producción de canolol comienza el cuarto día de cultivo para alcanzar 1,5 g/L el día D14 (productividad 108 mg/L.d), con un rendimiento molar del 81%, para la cepa *N. lepideus* BRFM 15; y 472 mg/L el día D13 (productividad 33 mg/L.d), con un rendimiento molar del 40%, para la cepa *N. lepideus* HHB14362-sp.

15 Podemos concluir de este experimento que las dos cepas de *N. lepideus* transforman eficazmente los dos compuestos probados, siendo la cepa HHB14362-sp menos eficaz que la cepa BRFM 15, mientras que las cepas *S. commune* BRFM 823 y *S. hirsutum* BRFM 889 no muestra actividad frente a la biotransformación del ácido sinápico, y una actividad de biotransformación del ácido ferúlico reducida en comparación con las cepas de *N. lepideus*.

20 H/ Liberación de ácido sinápico de tortas de colza por la enzima FaeA de *Aspergillus niger* - optimización de las condiciones

H. 1/ Materiales y métodos

25 La cantidad total de sinapina y ácido sinápico (AS) inicialmente presentes en la torta cruda se determinó por hidrólisis alcalina. Un gramo de torta de colza, previamente molida utilizando un molino de cuchillas IKA®-A11 Basic (Ika-Werke), se extrae tres veces con 8 mL de metanol al 70% con agitación a temperatura ambiente durante 20 min. Los extractos metanólicos se combinan y analizan por HPLC y luego se mezclan con 20 mL de NaOH 4 M durante 2 h a 30°C con agitación (160 rpm). La mezcla luego se acidifica a un pH de 1 con HCl al 37% y luego se analiza por HPLC.

30 Se utilizó un lote de FaeA recombinante producido de acuerdo con Record et al., Appl Microbiol Biotechnol, 2003; 62: 349-355. Se incuban 100 mL de regulador MOPS 100 mM pH 5,5 que contiene 5 g de torta de colza a 150 rpm y a temperaturas entre 30°C y 55°C durante 1 hora para homogeneizar la mezcla, luego se agregan cantidades de FaeA comprendidas entre 30,5 y 196 nkat.

El control consiste en 100 mL de regulador MOPS 100 mM pH 5,5, desprovisto de enzima, e incubado a 37, 45 o 55°C y 150 rpm con 5 g de torta de colza.

35 La liberación de ácido sinápico de la torta es seguida por análisis de HPLC, después de tiempos de incubación de 1, 2, 3 y 4 h.

H.2/ Resultados

La composición inicial de sinapina y ácido sinápico de la torta de colza se determinó después de una extracción con metanol de los compuestos fenólicos de la torta seguido de hidrólisis alcalina. Los resultados mostraron que la torta contiene 0,53% ($\pm 0,01$, n = 3) de sinapina y 0,74% ($\pm 0,04$, n = 3) de ácido sinápico.

40 Los resultados obtenidos para la hidrólisis enzimática de sinapina se muestran en la figura 11, para las diferentes temperaturas probadas ((a) 37°C, (b) 45°C, (c) 55°C).

Demuestran que un aumento en la temperatura de reacción, así como un aumento en la cantidad de enzima en el medio de reacción, tiene el efecto de inducir un aumento en la cantidad de ácido sinápico liberado de la torta de colza.

45 En general, la mayor cantidad de ácido sinápico liberado (0,74%) se obtiene a 55°C en presencia de 196 nkat de FaeA después de 3 h de incubación; en estas condiciones, el rendimiento de hidrólisis es del 100%. Las altas tasas de liberación también se logran mediante el uso de 131 nkat de enzima.

I/ Transformación de ácido ferúlico en 4-vinilguayacol y de ácido sináptico en canolol por un extracto intracelular bruto de *Neolentinus lepideus* BRFM 15

50 I.1/ Materiales y métodos

Se lleva a cabo un cultivo de *N. lepideus* BRFM 15 durante un período de 11 días en presencia de ácido sinápico

como inductor de la enzima PAD. En D11, el micelio se separa del sobrenadante por filtración en un filtro de 0,22 μm , se enjuaga 3 veces con 100 mL de regulador de fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5. Luego se muele (molino Ultra-Turrax® IKA® S25N25F, velocidad 13.500 rpm) 3 veces durante 1 minuto en hielo y en 40 mL de regulador de fosfato de sodio 100 mM pH 6,8 que contiene 650 mM de sorbitol y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), en presencia de 30 g de arena de Fontainebleau. La mezcla se centrifuga dos veces a 10 000xg durante 30 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante de centrifugación constituye el extracto celular bruto (CE) que contiene la PAD.

La reacción de biotransformación tiene lugar a 37°C durante 1 a 2 h, en el medio de reacción que contiene 50 mM de regulador de fosfato de sodio pH 6,5 y 2 mM de sustrato de bioconversión (ácido ferúlico AF o ácido sinápico AS). Después de detener la reacción agregando ácido acético glacial y metanol, el análisis de los compuestos fenólicos (producto de reacción; 4-vinilguayacol o canolol) se lleva a cabo por HPLC, a 220 nm y 30°C utilizando un sistema Agilent 1100 (Agilent Technologies), equipado con una columna de fase inversa C30 (YMC® Carotenoid 3 μm , 4,6 x 150 mm, Waters). La velocidad de elución se fija a 0,8 ml/min. La fase móvil es una mezcla de agua y acetonitrilo 95:5 (v/v) que contiene 0,05% de ácido fosfórico (disolvente A) y 100% de acetonitrilo (disolvente B). El gradiente es el siguiente: 10% de B durante 4 min, llevado al 40% en 9 min, luego al 100% en 1 min hasta el final del análisis (25 min). La cuantificación se realiza mediante calibración externa. La actividad se expresa en U/ml de extracto enzimático (una unidad U corresponde a 1 μmol de producto aparecido por hora).

La reacción de biotransformación se lleva a cabo a 30 o 37°C, en presencia de 1 o 3 mL de extracto celular (CE) que contiene la PAD.

I.2/ Resultados

Los resultados obtenidos para la biotransformación de sinapina en ácido sinápico y de ácido ferúlico en 4-vinilguayacol se muestran en la figura 12, para las diferentes temperaturas probadas ((a) 30°C, (b) 37°C).

En todas las condiciones probadas, se observa una aparición del producto vinilfenólico (4-vinilguayacol o canolol), que refleja la actividad de PAD en el extracto celular. Después de 2 h de incubación, la actividad de PAD es mayor a 37°C que a 30°C. La actividad, en presencia de 3 mL de EC, es 2,5 a 3 veces mayor que la medida en presencia de 1 mL de EC. Con una cantidad igual de extracto celular, la enzima PAD es particularmente eficaz para la biotransformación del ácido ferúlico.

J/ Características de la enzima PAD purificada del medio intracelular de la cepa *N. lepidus* BRFM 15

La enzima PAD de la cepa salvaje *N. lepidus* BRFM 15 es un homodímero con una masa molecular aparente de 40 \pm 2 kDa.

Parece de los experimentos descritos en el punto I/ anterior, así como de experimentos adicionales, que la enzima es activa en un intervalo de pH comprendido entre 5,5 y 7,5, preferiblemente de entre 6 y 6,5. También es activa en un intervalo de temperaturas comprendidas entre 30 y 55°C, preferiblemente de entre 37 y 45°C.

Además, en presencia de ácido ferúlico y ácido sinápico, en un regulador de fosfato de sodio 50 mM que contiene 2 mM de sustrato, la actividad máxima se obtiene después de 0,5 a 1 h de incubación. Por lo tanto, la actividad máxima de la PAD sobre el ácido sinápico como sustrato para la bioconversión en canolol, a 37°C y pH 6, es 7,34 \pm 0,13 U/ml de enzima, donde una unidad U corresponde a 1 μmol de canolol aparecido por hora. La actividad máxima de PAD sobre ácido ferúlico como sustrato de bioconversión en 4-vinilguayacol, a 45°C y pH 6,5, es 46,39 \pm 0,46 U/ml de enzima, donde una unidad U correspondiente a 1 μmol de 4-vinilguayacol aparecido por hora. Esto corresponde a una actividad específica de aproximadamente 8 U/mg de proteína en presencia de ácido sinápico y 51 U/mg de proteína en presencia de ácido ferúlico.

A 37°C, esta PAD es estable durante 8 h.

A 37°C y pH 6, se determinó que el K_M de la PAD era 2,65 mM para el ácido sinápico y 3,23 mM para el ácido ferúlico. A 45°C y pH 6,5, su k_{cat} es 20 s^{-1} para ácido sinápico y 135 s^{-1} para ácido ferúlico.

K/ Características de la enzima PAD recombinante purificada del medio extracelular de la cepa recombinante *A. niger* I-1472-PAD17

La enzima PAD de la cepa *N. lepidus* HHB14362 se produjo en forma heteróloga en un hongo teóricamente productor de proteínas, *Aspergillus niger*. La PAD nativa de esta cepa es intracelular.

K.1/ Materiales y métodos

La cepa *Aspergillus niger* D15#26 (pyrG⁻) deficiente en proteasa (descrita en la publicación de Van Hartingsveldt et al., Mol Gen Genetics. 1987, 206: 71-75) se usó para la expresión heteróloga de la PAD de *N. lepidus* HHB14362. El gen pyrG codifica la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa de *Aspergillus*, una enzima implicada en la síntesis de uridina.

5 Para la producción heteróloga de *N. lepideus* PAD por *A. niger* D15#26, el vector de expresión pANPAD se creó a partir del vector pAN52-4 (número EMBL: Z32699) que también contiene un gen para resistencia a la ampicilina. En este vector, la secuencia de codificación pad (de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6) se fusiona con la secuencia de direccionamiento de la glucoamilasa de *A. niger* (24 aminoácidos) seguido del sitio de escisión de la proteasa fúngica Kex2 (NVISKR).

Se usaron dos vectores en la cotransformación de la cepa de *A. niger* D15#26:

10 - el vector pAN-PAD, donde la expresión del gen pad está bajo el control: (i) del promotor constitutivo del gen *gpdA* de *Aspergillus nidulans*, que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, (ii) de la región terminadora del gen *trpC* de *A. nidulans*, un gen implicado en la vía de biosíntesis de triptófano. Este tipo de construcción ya se ha utilizado para la producción heteróloga de otras enzimas fúngicas, como se describe en particular en la publicación de Record et al., *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62: 349-355.

15 - el vector pAB4.1 (descrito en la publicación de Van Hartingsveldt et al., *Mol Gen Genetics*, 1987, 206: 71-75) que es un plásmido que tiene el gen *pyrG*. La cotransformación de la cepa *A. niger* D15#26 (*pyrG*⁻) por este vector cancela su auxotrofia para uridina, lo que permite la detección de cepas fúngicas transformadas en un medio que carece de uridina.

K.2/ Resultados

Esta construcción genética permitió secretar la proteína PAD recombinante activa en el medio extracelular. El clon de *A. niger* D15#26-PAD-17, que tenía el mejor nivel de producción de PAD (95 U/l), se seleccionó para purificar y caracterizar la PAD recombinante.

20 La PAD recombinante es un homodímero con una masa molecular de aproximadamente 40 kDa.

Se ha determinado que su actividad es de 2,236 y 0,250 U/ml con ácido ferúlico y ácido sináptico como sustratos, respectivamente, es decir, una actividad específica de 8,28 y 0,93 U/mg, respectivamente.

25 El estudio del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de la PAD recombinante ha demostrado que la enzima es activa para un pH comprendido entre 5,5 y 8, con un óptimo a pH 6-6,5, y para temperaturas comprendidas entre 25 y 55°C, con un óptimo a 35-40°C. También se determinó, con ácido ferúlico como sustrato, un K_M de 0,33 mM, que permanece más bajo que la gran mayoría del K_M determinado para la PAD bacteriana, lo que refleja una mejor afinidad de la PAD fúngica recombinante respecto del ácido ferúlico.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
 TERRES INOVIA
 TERRES UNIVIA L'INTERPROFESSION DES HUILES ET PROTEINES
 VEGETALES
 UNIVERSITE D'AIX MARSEILLE

30 <120> PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE UN COMPUESTO VINILFENÓLICO A PARTIR DE UN ÁCIDO HIDROXICINÁMICO PRECURSOR A PARTIR DE UNA TORTA DE SEMILLAS OLEAGINOSAS

<130> 31482 WO

<150> FR 1560393

<151> 2015-10-29

35 <160> 6

<170> Patent In version 3.5

<210> 1

<211> 162

<212> PRT

40 <213> *Neolentinus lepideus*

<400> 1

ES 2 764 142 T3

Met Ser His Glu Gly Ala Thr Ser Glu Glu Phe Lys Gln Ile Glu Gly
1 5 10 15

Lys Arg Phe Lys Tyr Thr Tyr Gly Leu Gly Trp Thr Tyr Glu Met Tyr
20 25 30

Phe Arg Ser Leu Thr Arg Cys Val Tyr Arg Ile Leu Ser Gly Pro Leu
35 40 45

Ala Gly Arg Val Asn Phe Gln His Ala His Tyr Gln Lys Ile Arg Asp
50 55 60

Asn Val Trp Gln Cys Ser Trp Leu Glu Glu Thr Gly Thr Val Val Ser
65 70 75 80

Met Val Val Asp Phe Asp Gln Gln Thr Val Lys Thr Phe Ala Thr Phe
85 90 95

Ser Arg Gly His Trp Asp Leu Pro Asp Gln Ala Lys Gly Trp Lys Arg
100 105 110

Asn Pro Glu Asp Met Ala Arg Trp Arg Thr Leu Ala Gln Lys Gly Lys
115 120 125

Asp Gln Ala Asp Lys His Val Leu Val Glu His Ala Lys Met Ser Glu
130 135 140

Leu Thr Ser Gly Gln Gly Asp Leu Pro Asp Ile Asp Asp Ser Trp Glu
145 150 155 160

Thr Met

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Neolentinus lepideus

<400> 2

Ser His Glu Gly Ala Thr Ser Glu Glu Phe Lys Gln Ile Glu Gly Lys
1 5 10 15

Arg

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Neolentinus lepideus

<220>

<221> característica_misc

<222> (2)..(2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

10 <220>

<221> característica_misc

<222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 3

Ile Xaa Ser Gly Pro Xaa Ala Gly Arg
1 5

15

<210> 4

<211> 31

<212> PRT

<213> Neolentinus lepideus

20 <220>

<221> característica_misc

<222> (26)..(26)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 4

Val Val Ser Met Val Val Asp Phe Asp Gln Gln Thr Val Lys Thr Phe
1 5 10 15

25

Ala Thr Phe Ser Arg Gly His Trp Asp Xaa Pro Asp Gln Ala Lys
20 25 30

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Neolentinus lepideus

ES 2 764 142 T3

<220>

<221> característica_misc

<222> (10)..(10)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

5 <400> 5

Gly Lys Asp Gln Ala Asp Lys His Val Xaa Val Glu His Ala Lys
1 5 10 15

<210> 6

<211> 489

<212> ADN

10 <213> Neolentinus lepideus

<400> 6

```

atgagccacg aaggagcaac gtcagaagag ttcaagcaga ttgaagggaa gcggttcaag      60
tacacgtatg gtttgggatg gacgtatgag atgtacttcc gctccttaac gcgatgtgta      120
taccggattc tttcggggcc tttggcgggt agagttaact tccagcatgc gcactaccag      180
aaaatcagag acaacgtctg gcaatgcagc tggctcgaag aaaccgggac agtagtctcc      240
atggttgtcg actttgatca acagactgtc aagactttcg caacgttctc gagaggccac      300
tgggatctcc ccgatcaggc gaaaggggtg aagcgcaatc cggaggacat ggcaagatgg      360
aggactctcg cgcagaaagg aaaggaccag gcagacaagc atgtgctagt cgaacatgcg      420
aaaatgtccg agttgacgag cgggcagggg gatctgccag acatagacga ttcttgggag      480
accatgtag                                     489
    
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de preparación de un compuesto vinilfenólico a partir de un ácido hidroxicinámico precursor, caracterizado porque comprende una etapa de biotransformación de dicho ácido hidroxicinámico al poner en contacto una enzima con actividad de descarboxilasa del ácido fenólico de un microorganismo de la especie *Neolentinus lepideus*.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha enzima presenta al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95% de identidad de aminoácidos con la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 10 3. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, según el cual la etapa de biotransformación del ácido hidroxicinámico se lleva a cabo cultivando células de dicho microorganismo de la especie *Neolentinus lepideus* en presencia de dicho ácido hidroxicinámico.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, utilizando la cepa de *Neolentinus lepideus* depositada con el número ATCC 36557 en ATCC.
- 15 5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha etapa de biotransformación del ácido hidroxicinámico se lleva a cabo en presencia en el medio de reacción de una resina capaz de adsorber el compuesto vinilfenólico formado a medida que se produce, en particular un copolímero de estireno y divinilbenceno.
6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, según el cual el ácido hidroxicinámico es ácido sináptico y el compuesto vinilfenólico es canolol.
- 20 7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, según el cual el ácido hidroxicinámico es ácido cafeico y el compuesto vinilfenólico es 4-vinilcatecol.
8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, según el cual el ácido hidroxicinámico es ácido ferúlico y el compuesto vinilfenólico es 4-vinilguayacol.
9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, según el cual el ácido hidroxicinámico es ácido p-cumárico y el compuesto vinilfenólico es 4-vinilfenol.
- 25 10. Procedimiento de producción de un compuesto vinilfenólico a partir de una torta de semillas oleaginosas, que comprende:
- una etapa de liberación de dicha torta de semillas oleaginosas de un ácido hidroxicinámico precursor de dicho compuesto vinilfenólico,
 - una etapa de transformación del ácido hidroxicinámico así liberado en dicho compuesto vinilfenólico por un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 30 11. Procedimiento de producción de acuerdo con la reivindicación 10, según el cual la semilla oleaginosa se selecciona de entre colza, girasol y soja.
12. Procedimiento de producción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, según el cual la etapa de liberación del ácido hidroxicinámico de la torta de semillas oleaginosas se lleva a cabo poniendo en contacto dicha torta de semillas oleaginosas con una enzima de tipo cinamoil esterasa de un microorganismo de la especie *Aspergillus niger*.
- 35 13. Procedimiento de producción de acuerdo con la reivindicación 12, según el cual la etapa de liberación del ácido hidroxicinámico se lleva a cabo poniendo en contacto la mezcla de semillas oleaginosas con una preparación enzimática derivada del sobrenadante de un cultivo celular de dicho microorganismo de la especie *Aspergillus niger* en presencia de un sustrato natural seleccionado de entre las tortas de semillas oleaginosas y la pulpa de remolacha azucarera.
- 40

FIG 1

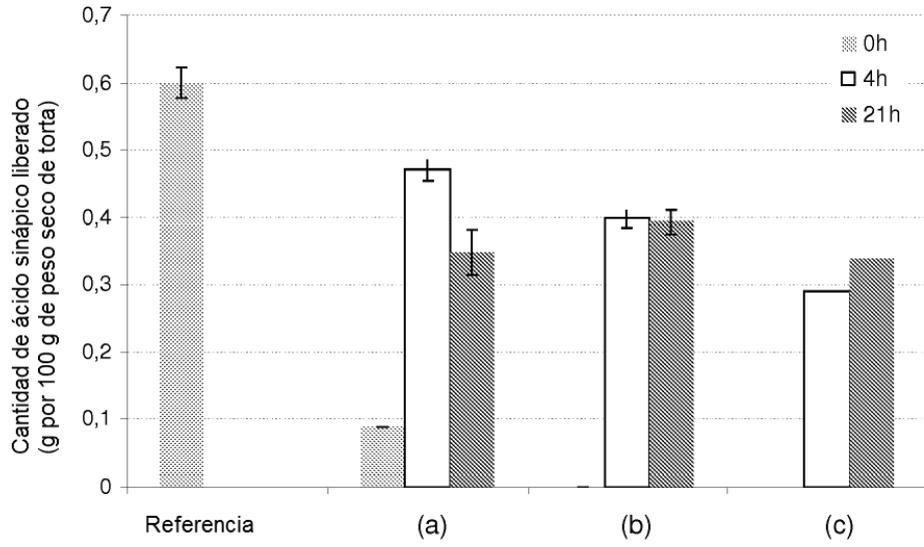


FIG 2

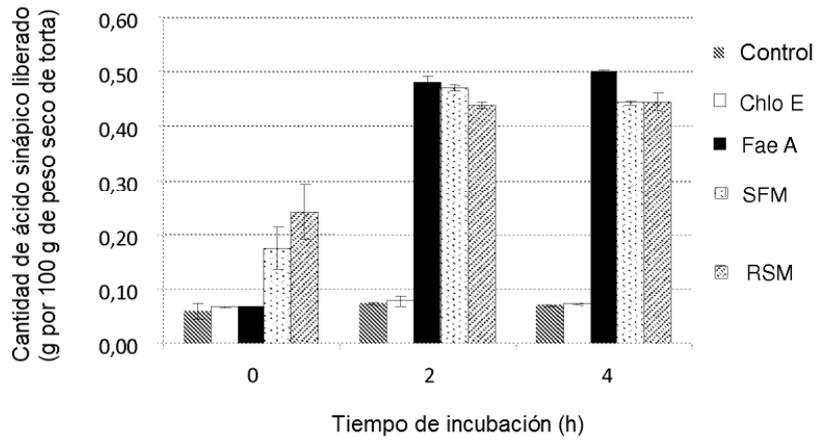
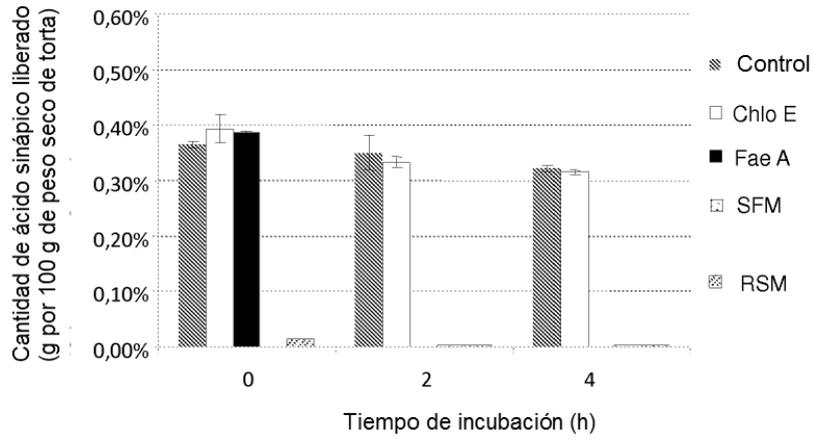


FIG 3



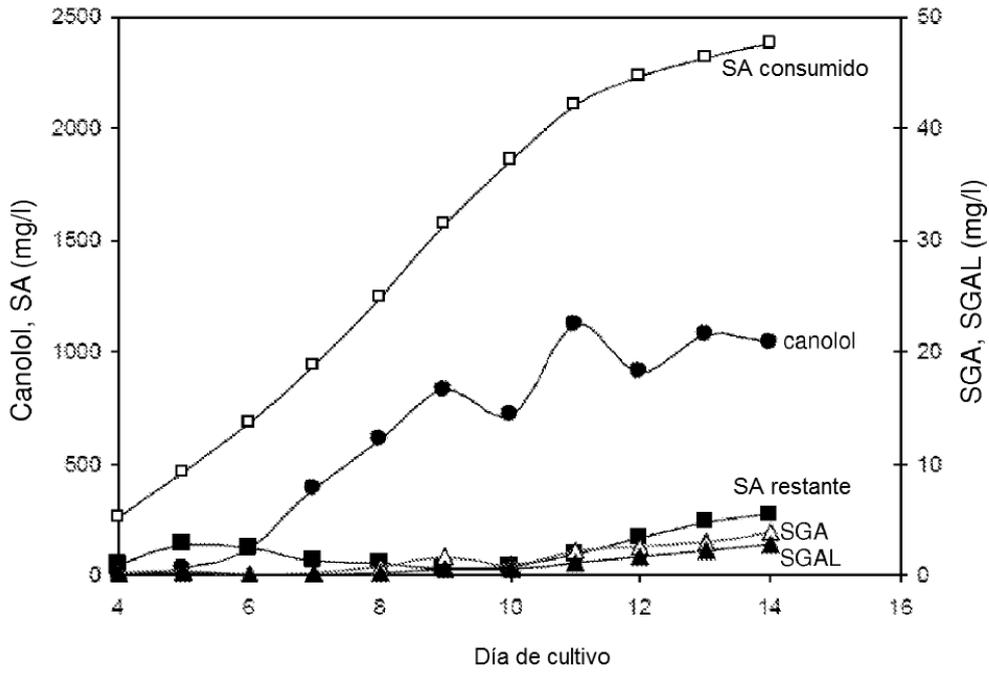


FIG 4

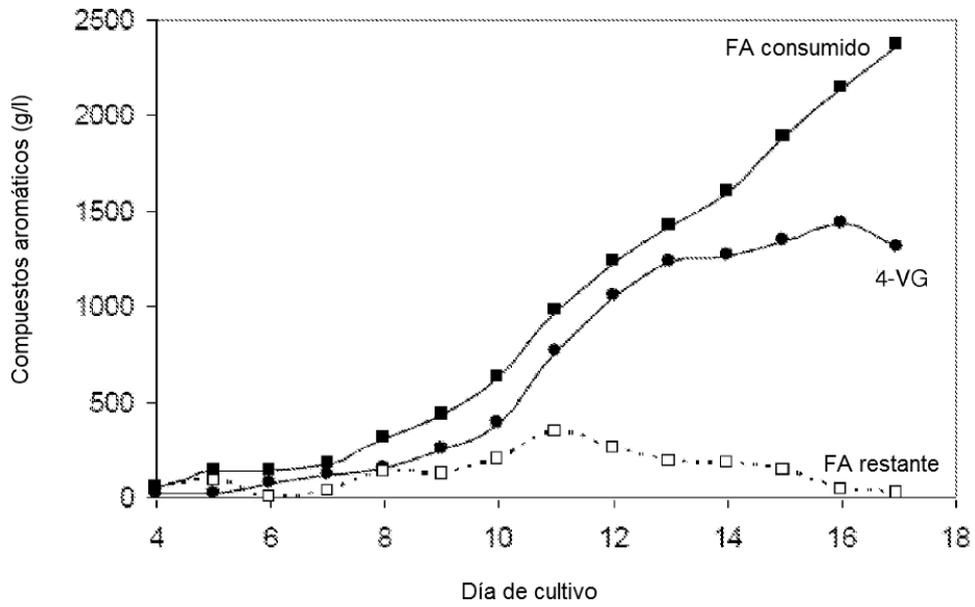
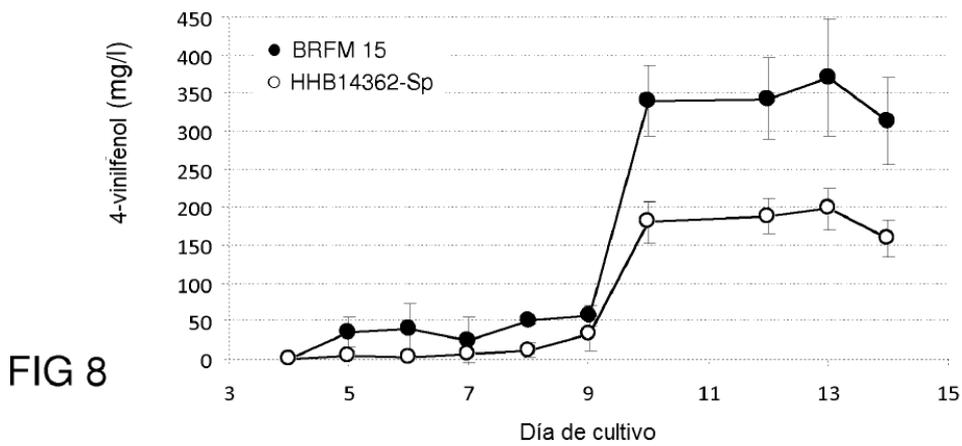
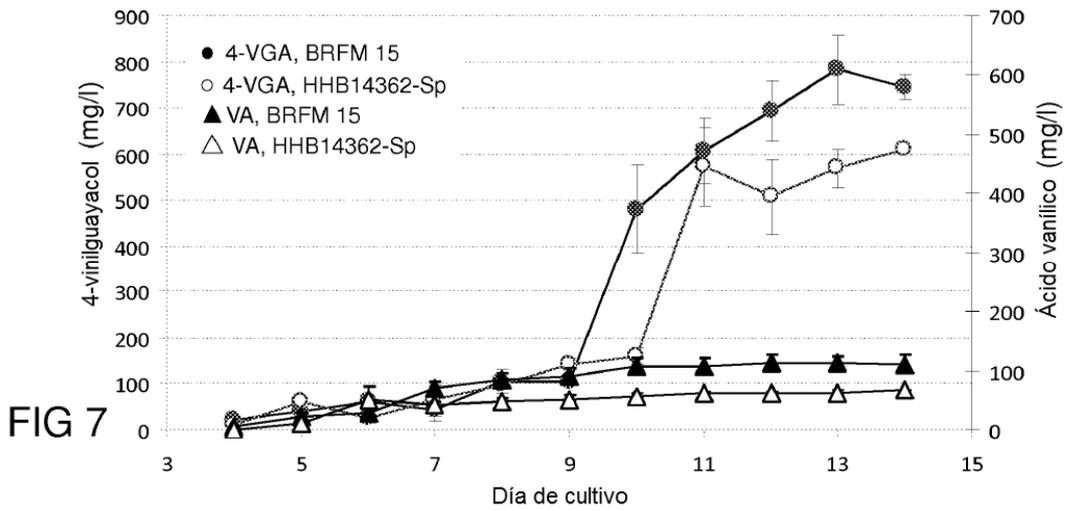
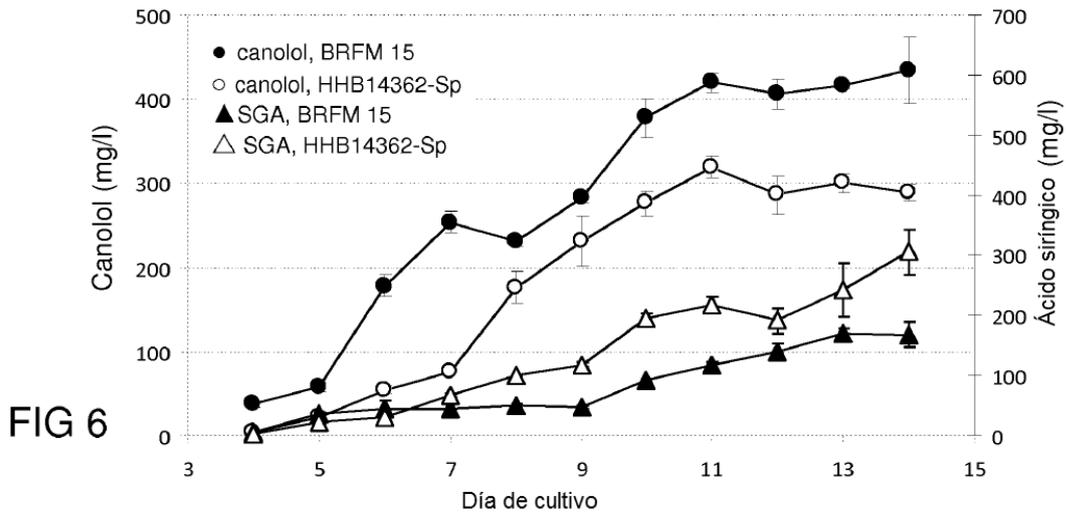


FIG 5



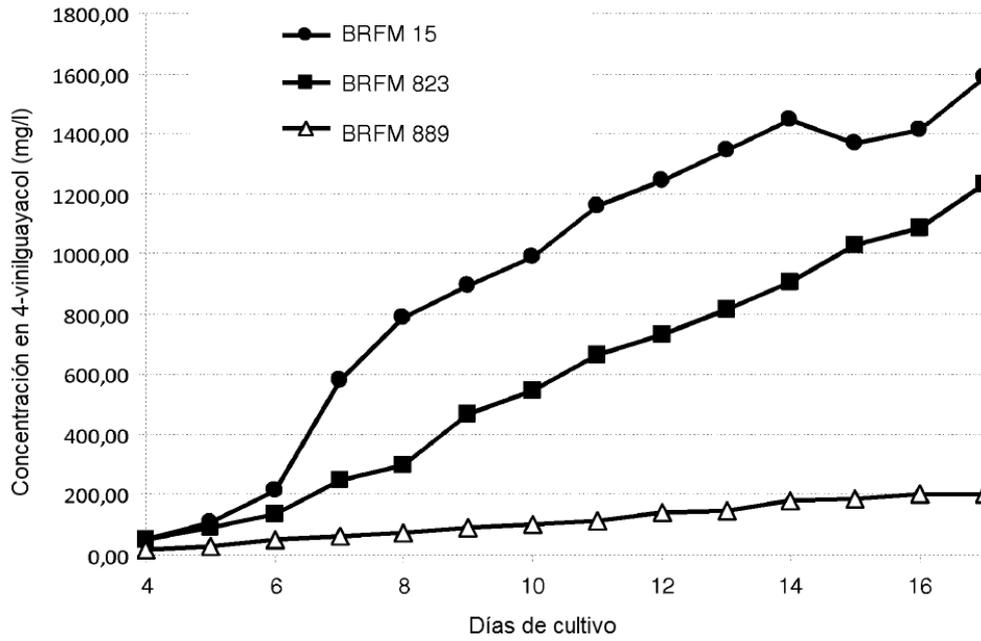


FIG 9

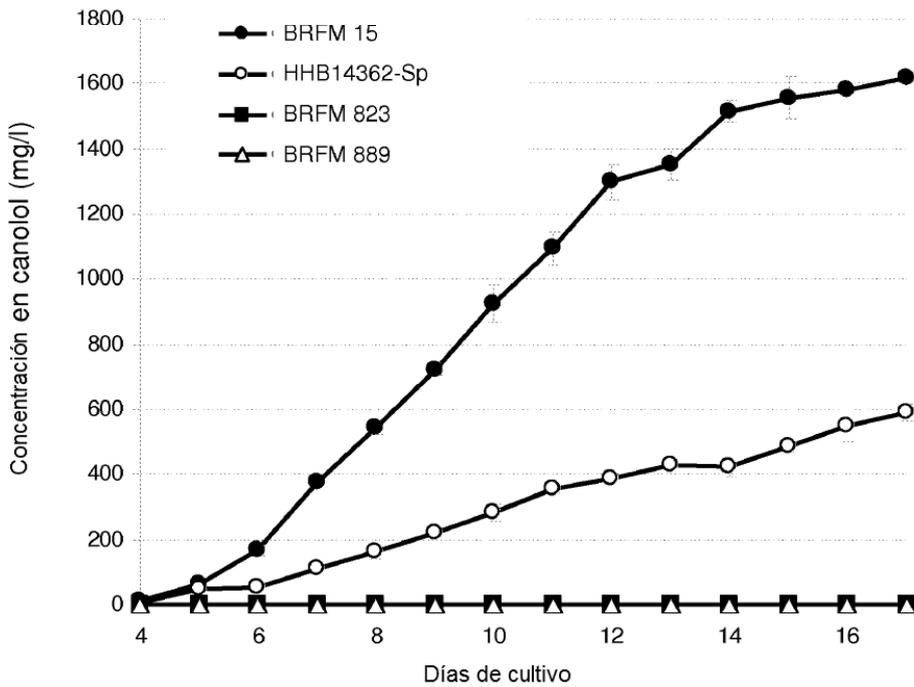


FIG 10

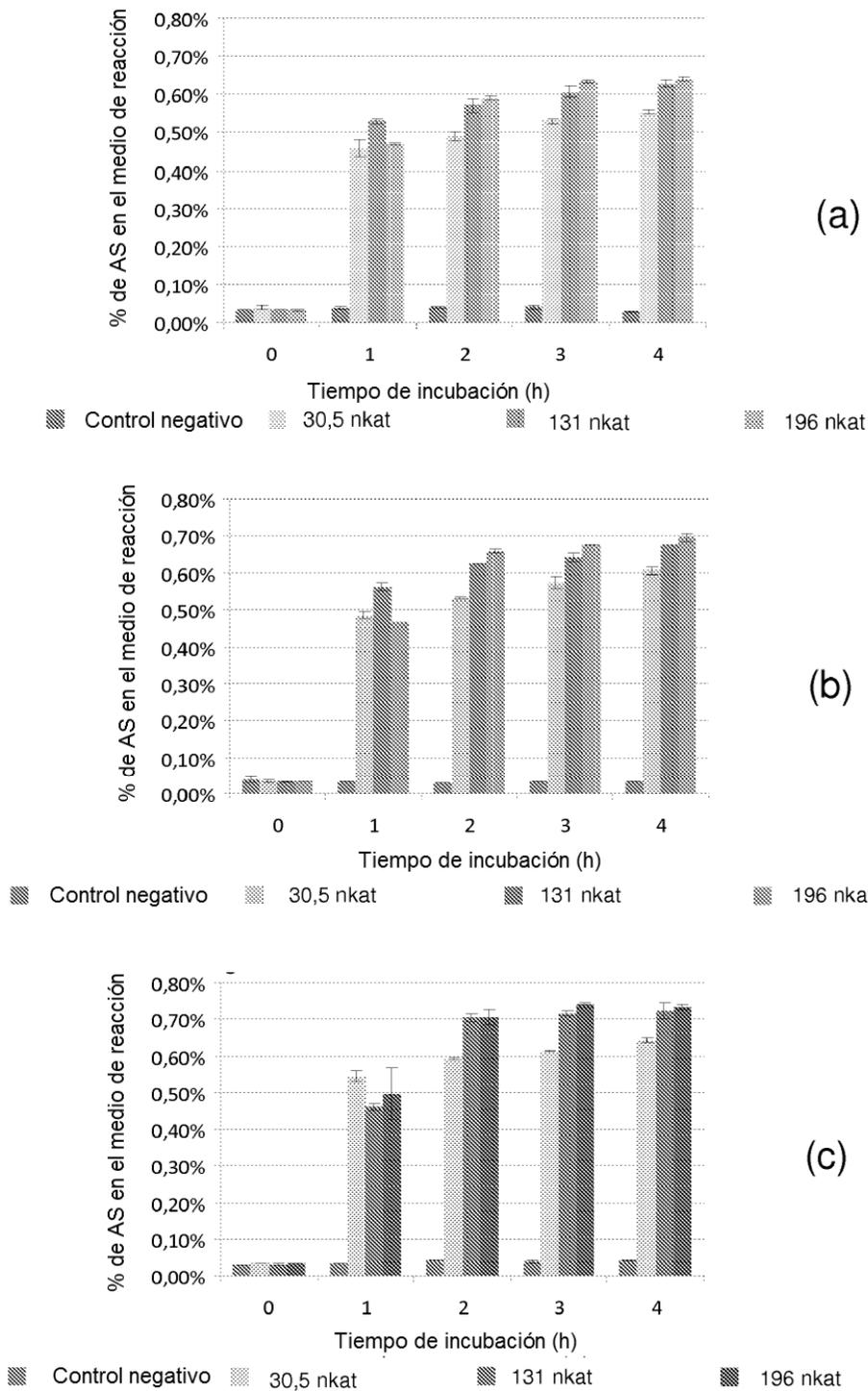


FIG 11

