



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 301 453**

② Número de solicitud: 200800436

⑤ Int. Cl.:

C07C 39/08 (2006.01)

C07C 229/36 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **18.02.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2008**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.06.2008

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Murcia**
Avda. Teniente Flomesta, 5
30003 Murcia, ES

⑦ Inventor/es: **García Ruiz, Pedro Antonio;**
García Cánovas, Francisco y
Marín Zamora, María Elisa

⑦ Agente: **Temño Ceniceros, Ignacio**

⑤ Título: **Procedimiento de obtención de *o*-difenoles.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de obtención de *o*-difenoles.

Procedimiento de síntesis enzimática de *o*-difenoles a partir del correspondiente monofenol que es susceptible de ser hidroxilado en posición orto con respecto al grupo hidroxilo. La reacción es catalizada enzimáticamente con tirosinasa y transcurre en presencia de tampón borato.

ES 2 301 453 A1

ES 2 301 453 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de *o*-difenoles.

5 La presente invención se refiere al campo de los procedimientos de síntesis de sustancias y tiene por objeto un procedimiento de síntesis enzimática de *o*-difenoles a partir del correspondiente monofenol.

Estado de la técnica anterior

10 Tirosinasa (monofenol monooxigenasa) (EC 1.14.18.1; número CAS: 9002-10-2) es una enzima que cataliza la hidroxilación de fenoles (como la tirosina) y está extendida en plantas y animales. Tirosinasa es una enzima con cobre presente en tejidos de plantas y animales que cataliza la producción de melanina y otros pigmentos a partir de tirosina por oxidación. Las tirosinasas han sido aisladas y estudiadas desde una amplia variedad de plantas, animales y especies de hongos. Las tirosinasas de diferentes especies son distintas en términos de sus propiedades estructurales, distribución de tejido y ubicación celular.

En Food Technol. Biotechn. 2007, 45: 287-294, se describe el potencial biotecnológico de tirosinasa para la producción de L-dopa y otros *o*-difenoles, y en él se relatan diversas experiencias utilizando diferentes condiciones de reacción tanto para enzima libre como inmovilizada en diferentes medios. En dicho artículo de revisión se afirma que los procedimientos de obtención de L-dopa mediante tirosinasa probablemente nunca sean comercializados, porque hay un procedimiento para su obtención con otra enzima (tirosina - fenol-liasa)(TPL) a partir de una mezcla de piruvato, amoníaco y catecol sin que el L-dopa formado se oxide en el medio de reacción a L-dopaquinona como ocurre con tirosinasa debido a su actividad difenolasa. Además también se afirma que en los intentos realizados hasta ahora, las productividades de L-dopa obtenidas incluso utilizando enzima inmovilizada varían entre 1,44 y 54 mg/l.h y son todavía relativamente bajas debido fundamentalmente a dos causas:

1.- La conversión de L-tirosina añadida es incompleta, consumiéndose menos del 30% en el proceso.

2.- Parte del L-dopa producido se pierde en el proceso por oxidación a L-dopaquinona, posterior ciclación a leucodopacromo seguida de oxidación a dopacromo y polimerización a melaninas (Ver esquema de la Figura 1).

Aunque es conocido que para minimizar la formación de melaninas se puede añadir ascorbato que reduce la *o*-dopaquinona a L-dopa, no pueden emplearse altas concentraciones de ascorbato porque entonces éste inactiva la tirosinasa irreversiblemente, por ello en muchos de los procedimientos anteriores, se emplean concentraciones bajas de ascorbato y se adiciona paulatinamente conforme se va consumiendo para evitar la inactivación de la enzima, pero eso no evita que a tiempos largos y cuando hay acumulación de *o*-difenoles, tome importancia la formación de melaninas.

En la patente española ES2170006 se describe un procedimiento de preparación de hidroxitirosol, donde la reacción es catalizada por el enzima tirosinasa en un medio tamponado con fosfato en medio acuoso, a pH neutro. El medio de reacción se compone de tirosol, como precursor; tirosinasa de champiñón, como catalizador; y vitamina C en exceso. Lo indicado en dicha patente española respecto a los rendimientos obtenidos por el procedimiento descrito (próximos al 100%), está en clara contradicción con lo indicado en Food Technol Biotechnol, 2007, 45 (3): 287-294, donde se indica que para la transformación de L-tirosina a L-Dopa mediante el procedimiento clásico (usando tampón fosfato) los rendimientos son menores del 30%.

En J Biol Chem, 1957, 227: 473 - 482 se indica que la producción de *o*-difenoles a partir de monofenoles en presencia de borato y utilizando la enzima tirosinasa como catalizador, no es posible debido a que se inhibe la actuación de la enzima. En concreto, se indica que en presencia de ascórbico y tirosina, el borato también inhibe la acción de la enzima.

En J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 13034-13035, se indica que la producción enzimática se detiene cuando se adiciona borato, es decir no habría reacción ni sería posible la obtención de *o*-difenoles en presencia de borato. En concreto, se afirma que el consumo de oxígeno por oxidación de catecol en presencia de tirosinasa se suprimió cuando el medio era tampón borato 0,5 M (pH=9). Más aún, se indica que la oxigenación de fenoles fue completamente prohibida en tampón borato.

Explicación de la invención

La presente invención se enfrenta al problema técnico de la obtención de *o*-difenoles a partir de los correspondientes monofenoles en presencia de la enzima tirosinasa.

Sorprendentemente, se ha encontrado que la síntesis enzimática de *o*-difenoles a partir del correspondiente monofenol que presenta una posición en orto susceptible de ser hidroxilada, con la enzima tirosinasa como catalizador, ácido ascórbico o una sal del mismo y en presencia de tampón borato, es posible y permite obtener *o*-difenoles con un elevado grado de conversión de monofenol a *o*-difenoles. Permitiendo así mismo alcanzar concentraciones altas de *o*-difenoles en el medio sin que la mayor parte de los ciclos sean inútiles, tiempos de reacción más cortos y bajo consumo de ácido ascórbico o una sal del mismo (AA). En el contexto de la presente invención, se entiende por ciclo inútil la oxidación de *o*-difenoles por la enzima a *o*-quinona y su reducción con ascórbico.

ES 2 301 453 A1

En la Figura 2 se esquematizan las etapas del ciclo catalítico de tirosinasa en el que se obtienen *o*-difenoles a partir de los correspondientes monofenoles mediante la reducción de las *o*-quinonas formadas con ascorbato o ácido ascórbico. La enzima tiene tres formas, de las cuales solo la Eox es activa frente a monofenoles y en su actuación hay dos etapas red-ox:

5

- a).- la hidroxilación en orto del monofenol; y
- b).- la oxidación del *o*-difenol generado a *o*-quinona.

10 De estas etapas puede darse solo la primera y con ello liberar *o*-difenol al medio pasando a la forma Em o bien darse las dos y generar *o*-quinona pasando en la etapa a) a la forma Em y en la b) de Em a la forma Ed.

15 Esta liberación de *o*-difenol al medio es la causa de las muy bajas velocidades iniciales observadas (lag) por quedar la enzima en la forma Em que no solo no es activa frente a monofenoles, sino que además conduce a una vía muerta en su presencia. Para salir del lag es necesario pasar la mayor parte de la enzima a su forma Ed (y con oxígeno a Eox) y eso solo se produce cuando la cantidad de *o*-difenol acumulado alcanza unos valores que le permiten competir con el monofenol y a través de su oxidación a *o*-quinona puede sacar a la enzima de la vía muerta.

20 Por otro lado, para obtener *o*-difenoles, la reacción se hace en presencia de ascórbico o ascorbato (AA), la *o*-quinona es reducida a *o*-difenol (oxidándose el AA a ácido dehidro ascórbico (AAox), así el *o*-difenol se acumula en el medio y facilita la salida de la enzima del lag (o periodo de retardo).

25 El punto débil que presenta el ciclo catalítico de tirosinasa para obtener *o*-difenoles radica únicamente en que cuando el *o*-difenol alcanza una concentración suficiente, comienza a competir con el monofenol por la forma Eox. Cuando una molécula de *o*-difenol es oxidada a *o*-quinona por la forma Eox, esta pasa a Em y es necesario que otra molécula de *o*-difenol se oxide a *o*-quinona para pasar a Ed y con oxígeno de nuevo a Eox, es decir se genera un ciclo inútil en el que se consumen dos moléculas de AA para restablecer la situación de partida.

30 Esta imposibilidad de alcanzar concentraciones altas de *o*-difenol en el medio sin que la mayor parte de los ciclos sean inútiles es lo que ha provocado hasta ahora los bajos rendimientos en la transformación, los largos tiempos de reacción y los altos consumos de AA.

35 De las investigaciones llevadas a cabo por los investigadores, dado el conocimiento profundo del mecanismo de actuación de la enzima, y en contra de lo esperado por lo indicado en el estado de la técnica, se ha podido demostrar que la presencia de tampón borato en el medio de reacción permite superar los puntos débiles y dificultades expresados en el estado de la técnica.

40 Con la presencia de borato en el medio de reacción se consigue la formación de complejos con borato tanto de los *o*-difenoles obtenidos, como del ascorbato añadido (Figura 3).

45 La formación de los complejos de los *o*-difenoles con borato hace que la concentración de *o*-difenol sin complejar en el medio sea únicamente la mínima que permite la constante de formación del complejo con lo que aún a grandes concentraciones de *o*-difenol formado y bajas de monofenol por reaccionar, se minimizan los ciclos inútiles y además hace posible obtener altos rendimientos en *o*-difenol con respecto al monofenol de partida añadido.

50 Por otro lado, el ascorbato forma también complejos con borato que así mismo provoca que su concentración sin complejar en el medio sea muy pequeña con lo que pueden añadirse altas concentraciones al medio, evitando así que en su defecto las *o*-quinonas evolucionen irreversiblemente a polímeros con la consiguiente pérdida de rendimiento o que ocurran otros efectos indeseados como el que actúe como sustrato de la enzima o la inhiba.

55 Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, ésta proporciona un procedimiento de preparación de *o*-difenoles que comprende

- a) poner en contacto un monofenol derivado susceptible de ser hidroxilado en posición orto con respecto al grupo hidroxilo, con ácido ascórbico o una sal del mismo, tirosinasa y tampón borato; y
- b) separación del *o*-difenol obtenido.

60 Los intervalos óptimos de los distintos parámetros que afectan al proceso se optimizarán en cada caso para las peculiaridades del proceso elegido, atendiendo principalmente a opciones sintéticas como:

- Naturaleza del *o*-difenol a obtener
- Fuente de la enzima (champiñón, pera, manzana, fresa, mora, etc.).
- En disolución o tipo y soporte de inmovilización
- Disolvente elegido.

65

ES 2 301 453 A1

Según un modo de realización preferido, la concentración de borato será la máxima admitida por su solubilidad en el disolvente y pH empleado (que en todo momento es siempre $\text{pH} > 2$); mientras que la proporción de ácido ascórbico será la suficiente para que no se detecten *o*-quinonas en el medio (ausencia de coloración). De acuerdo con una realización más preferida, la proporción de ascórbico será del orden de 3 a 15 veces la concentración de monofenol a hidroxilar.

La concentración óptima de monofenol será normalmente la máxima permitida por su solubilidad en el medio de reacción, aunque concentraciones menores también pueden utilizarse.

Los pH de trabajo se determinarán teniendo en cuenta en cada caso el pH óptimo para una enzima de una fuente particular en el soporte concreto elegido y el pH óptimo del complejo con borato del *o*-difenol a obtener, logrando una solución de compromiso. En cualquier caso estarán entre valores comprendidos entre $\text{pH} = 2$ y $\text{pH} = 11$.

Los intervalos de temperatura óptima se determinarán en cada caso teniendo en cuenta la vida media de la enzima a esa temperatura en las condiciones de realización y se encontrarán entre 5 y 80°C, dependerán principalmente de la fuente de la enzima y el medio de inmovilización y/o disolvente. La reacción puede llevarse a cabo en presencia de disolventes o mezcla de disolventes inertes a la reacción, preferiblemente el disolvente es agua.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, se añade un *o*-difenol al medio de reacción, siendo la cantidad añadida la suficiente como para que en su equilibrio de complejación con borato, la concentración de *o*-difenol libre sea al menos la mínima necesaria para que la enzima salga del lag. Aunque anteriormente a la invención se creía que no podía darse actividad monofenolasa en presencia de borato y se usaban reductores como NH_2OH para completar el ciclo catalítico en el paso de Em a Ed, según este modo de realización de la presente invención, se ceba el medio de reacción añadiendo cantidades de *o*-difenol tan altas como para que en su equilibrio de complejación con borato, la concentración de *o*-difenol libre sea al menos la mínima necesaria para salir del lag, es decir para que la etapa de paso de Em a Ed tenga una velocidad algo mayor que la de hidroxilación del monofenol (paso de Eox M a Em) y con ello se alcance la velocidad máxima de proceso.

Según una realización preferida de la presente invención, el procedimiento de síntesis enzimático tiene lugar añadiendo al medio de reacción peróxido de hidrógeno. Según una realización particular de la presente invención, la cantidad añadida de peróxido de hidrógeno es de como máximo 100 μM . La presencia de pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno añadidas en el medio de reacción, catalizan el proceso por realizar el paso de la forma Em de la enzima a la forma Eox.

En una realización preferida, la tirosinasa está inmovilizada en un soporte sólido, siendo en tal caso preferido el proceso cuando se lleva a cabo en flujo continuo, y conectando entre sí en serie uno o más reactores.

El empleo de sistemas en flujo continuo permite controlar por fases el proceso, así como separar alícuotas de las fases más productivas y aprovechar íntegramente las últimas fases del proceso en las que la concentración de monofenol es baja.

El procedimiento descrito puede utilizarse con tirosinasas de diferente origen inmovilizadas o no y admite la realización en flujo continuo.

La oxigenación de las disoluciones puede realizarse mediante cualquiera de las técnicas conocidas (goteo al aire, burbujeo de aire, agitación en un depósito, nebulización, spray, etc.), manteniendo una concentración próxima a 0,26 mM (saturación).

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el procedimiento transcurre con oxigenación de las disoluciones, siendo preferido un sistema de nebulización o spray. Por ejemplo si se hace en columnas de relleno, la incorporación de la disolución a cabeza de columna puede hacerse mediante nebulización con lo que se garantiza la adecuada oxigenación del medio de reacción.

Según un modo de realización, la tirosinasa es inmovilizada sobre un soporte que sirve de relleno de dos columnas (A y B) como reactores. La figura 4 muestra un esquema del montaje descrito. Esta realización prevé tres depósitos (1, 2 y 3) para las disoluciones acuosas de cada fase. El depósito 1 contiene la disolución de monofenol en el correspondiente tampón borato a una concentración predeterminada. El depósito 2 contiene la disolución que sale del reactor primero (Columna A) y dependiendo de las condiciones empleadas (flujo, esbeltez de la columna, temperatura etc.) la disolución saliente contendrá concentraciones predeterminadas de monofenol y de *o*-difenol. El depósito 3 contiene la disolución que sale del reactor segundo (Columna B) y que es la disolución resultante del proceso total. Como puede comprobarse siguiendo el esquema de la Figura 4, el flujo entrante al reactor A está compuesto en aproximadamente un 50% del depósito 1 y aproximadamente un 50% del depósito 2. El 50% restante del flujo entrante al depósito 2 que no ha sido incorporado al reactor A, se incorpora al reactor B con lo que en ese caso partiendo de las concentraciones del depósito 2 en el reactor B se llega a las concentraciones finales del depósito 3 donde se almacena la producción para después aislar y purificar el *o*-difenol obtenido.

Para la purificación de los *o*-difenoles obtenidos, cuando el procedimiento se realiza con tirosinasa inmovilizada, basta separar el monofenol de partida no transformado (que en la mayor parte de los casos su concentración es muy

baja) del *o*-difenoel obtenido como complejo con borato y el ascorbato residual. Existen diversos procedimientos conocidos en la técnica que se podrían emplear. Por ejemplo para purificar L-dopa se puede emplear un procedimiento basado en filtración y precipitación cambiando el pH de la disolución.

5 En el contexto de la presente invención, el término “tirosinasa” hace referencia a una enzima (EC 1.14.18.1; número CAS: 9002-10-2) que cataliza la hidroxilación de fenoles (como la tirosina) y está extendida en plantas y animales. La tirosinasa tiene dos actividades enzimáticas, una hidroxilando monofenoles (“cresolasa”) y otra oxidando difenoles a quinonas (“catecolasa”). Dependiendo de la fuente, la actividad “cresolasa” es mayor o menor, incluso inexistente en algunos casos. En cambio, todas las enzimas tienen actividad “catecolasa”. Son conocidas en el estado de la técnica,
10 tirosinasa procedentes de diferentes fuentes. Evidentemente estas tirosinasas presentan diferencias en cuanto a su actividad y condiciones óptimas de reacción. No obstante, para la realización de la presente invención, es posible utilizar tirosinasa procedente de cualquier fuente, siendo preferida la tirosinasa de champiñón.

15 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos.

Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

Breve descripción de los dibujos

25 Figura 1. Representa el mecanismo por el que la enzima tirosinasa convierte L-tirosina en L-DOPA y posteriormente a *o*-dopaquinona, mostrándose además las reacciones espontáneas que llevan a la conversión de *o*-dopaquinona en dopacromo y melaninas y a la regeneración de L-DOPA a partir de *o*-dopaquinona si L-ascorbato es añadido al medio de reacción.

30 Figura 2. En esta figura se esquematizan las etapas del ciclo catalítico de tirosinasa. Se obtienen *o*-difenoles a partir de los correspondientes monofenoles y mediante la reducción de las *o*-quinonas formadas con ascorbato o ácido ascórbico.

Figura 3. correspondiente al ciclo catalítico de tirosinasa según la figura 2, pero donde se utiliza la formación de los correspondientes complejos con borato.

35

Figura 4. Esquema de la obtención en flujo continuo con solo dos reactores.

Exposición detallada de modos de realización

40

En la realización de los ejemplos siguientes se utilizó tirosinasa de champiñón inmovilizada sobre bolitas de vidrio recubiertas con cinamato de sorbitol según el procedimiento y concentraciones descritos en J. Biotechnol. 2007, 131: 388-396 y se realizó a temperatura ambiente.

45 Ejemplo 1

Obtención de L-Dopa

50 Se utilizó un reactor de tirosinasa inmovilizada sobre 22 g de bolitas de vidrio (matriz inerte) recubiertas de cinamato de sorbitol (soporte de inmovilización), el reactor funcionó en flujo continuo con un volumen recirculante de 11.5 ml.

55 La disolución de partida contenía 1 mM de L-tirosina, 0.4 mM de L-dopa y 15 mM de AA en medio tampón borato 0.5 M, pH 9. Tras 2 h de reacción se obtuvo un rendimiento del 76% en la producción de L-dopa, y después de 3.5 h un rendimiento del 90%.

Ejemplo 2

Obtención de o-dihidroxianisol

60

Se utilizó un reactor de tirosinasa inmovilizada sobre 22 g de bolitas de vidrio (matriz inerte) recubiertas de cinamato de sorbitol (soporte de inmovilización), el reactor funcionó en flujo continuo con un volumen recirculante de 11.5 ml.

65 La disolución de partida contenía 1 mM de hidroxianisol, 0.4 mM de *o*-dihidroxianisol y 4.2 mM de AA en medio tampón borato 0.5 M, pH 9. Tras 10 min de reacción se obtuvo un rendimiento del 76% en la producción de *o*-dihidroxianisol, y después de 15 min un rendimiento del 90%.

ES 2 301 453 A1

Ejemplo 3

Obtención de 4-metilcatecol

5 Se utilizó un reactor de tirosinasa inmovilizada sobre 22 g de bolitas de vidrio (matriz inerte) recubiertas de cinamato de sorbitol (soporte de inmovilización), el reactor funcionó en flujo continuo con un volumen recirculante de 11.5 ml.

10 La disolución de partida contenía 1 mM de metilfenol, 0.4 mM de metilcatecol y 3 mM de AA en medio tampón borato 0.5 M, pH 9. Tras 20 min de reacción se obtuvo un rendimiento del 82% en la producción de metilcatecol, y después de 30 min un rendimiento del 98%.

Ejemplo 4

15 *Obtención de 4-tertbutilcatecol*

Se utilizó un reactor de tirosinasa inmovilizada sobre 22 g de bolitas de vidrio (matriz inerte) recubiertas de cinamato de sorbitol (soporte de inmovilización), el reactor funcionó en flujo continuo con un volumen recirculante de 11.5 ml.

20 La disolución de partida contenía 1 mM de tertbutifenol, 0.4 mM de tertbutilcatecol y 3 mM de AA en medio tampón borato 0.5 M, pH 9. Tras 0.75 h de reacción se obtuvo un rendimiento del 70% en la producción de metilcatecol, y después de 1.5 h un rendimiento del 96%.

25 Ejemplo 5

Obtención de ácido 3,4-dihidroxifenilacético

30 Se utilizó un reactor de tirosinasa inmovilizada sobre 22 g de bolitas de vidrio (matriz inerte) recubiertas de cinamato de sorbitol (soporte de inmovilización), el reactor funcionó en flujo continuo con un volumen recirculante de 11.5 ml.

35 La disolución de partida contenía 1 mM de ácido 4-hidroxifenilacético, 0.4 mM de ácido 3,4-dihidroxifenilacético y 3 mM de AA en medio tampón borato 0.5 M, pH 9. Tras 1 h de reacción se obtuvo un rendimiento del 79% en la producción de ácido 3,4-dihidroxifenilacético.

Ejemplo 6

40 *Obtención de ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico*

Se utilizó un reactor de tirosinasa inmovilizada sobre 22 g de bolitas de vidrio (matriz inerte) recubiertas de cinamato de sorbitol (soporte de inmovilización), el reactor funcionó en flujo continuo con un volumen recirculante de 11.5 ml.

45 La disolución de partida contenía 1 mM de ácido 4-hidroxifenilpropiónico, 0.4 mM de ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico y 3 mM de AA en medio tampón borato 0.5 M, pH 9. Tras 40 min de reacción se obtuvo un rendimiento del 77% en la producción de ácido 3,4-dihidroxifenilacético y después de 45 min un rendimiento del 95%.

50

55

60

65

ES 2 301 453 A1

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de *o*-difenoles **caracterizado** porque comprende:

- 5
- a) poner en contacto un monofenol susceptible de ser hidroxilado en posición orto con respecto al grupo hidroxilo, con ácido ascórbico o una sal del mismo, tirosinasa y tampón borato; y
 - b) posterior separación del *o*-difenoel obtenido.

10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque en la etapa a) se añade un *o*-difenoel al medio de reacción.

15 3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-2, **caracterizado** porque en la etapa a) se añade al medio de reacción peróxido de hidrógeno.

4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-3, **caracterizado** porque la enzima está inmovilizada en un soporte sólido.

20 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado** porque el soporte de inmovilización de tirosinasa es un éster del ácido cinámico.

6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-5, **caracterizado** porque el procedimiento se lleva a cabo en flujo continuo.

25 7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-6, **caracterizado** porque se lleva a cabo con oxigenación de las disoluciones.

30 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado** porque el proceso de oxigenación se lleva a cabo mediante un sistema de nebulización o spray.

9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 8, **caracterizado** porque el *o*-difenoel obtenido es L-dopa.

35 10. Procedimiento de preparación de L-dopa **caracterizado** por:

- a) poner en contacto L-tirosina, con ácido ascórbico o una sal del mismo, tirosinasa y tampón borato;
- b) opcionalmente cebar el medio de reacción con L-dopa u otro *o*-difenoel;
- c) opcionalmente se añade al medio de reacción peróxido de hidrógeno; y
- d) posterior separación de la L-dopa obtenida del medio de reacción.

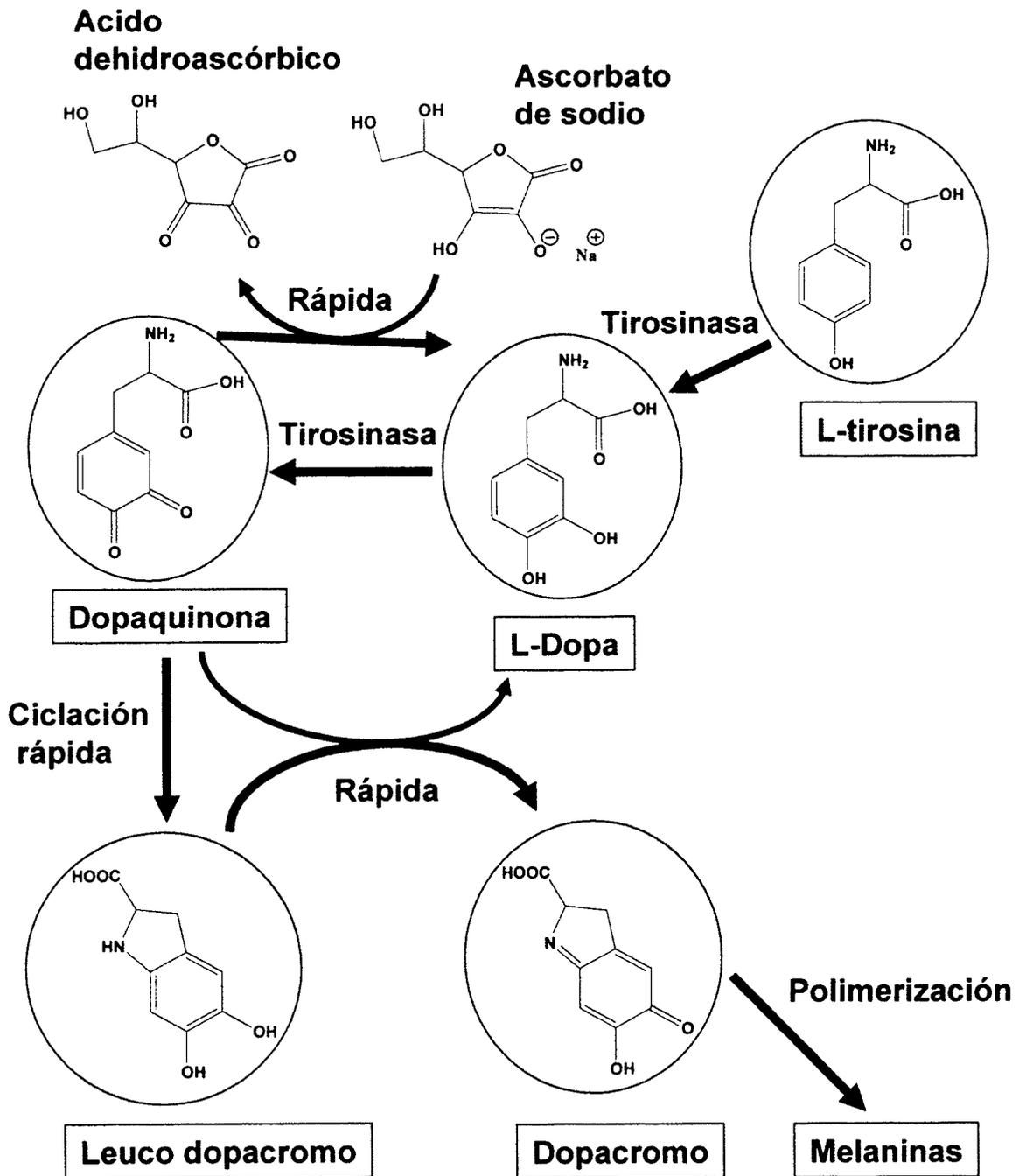


Figura 1

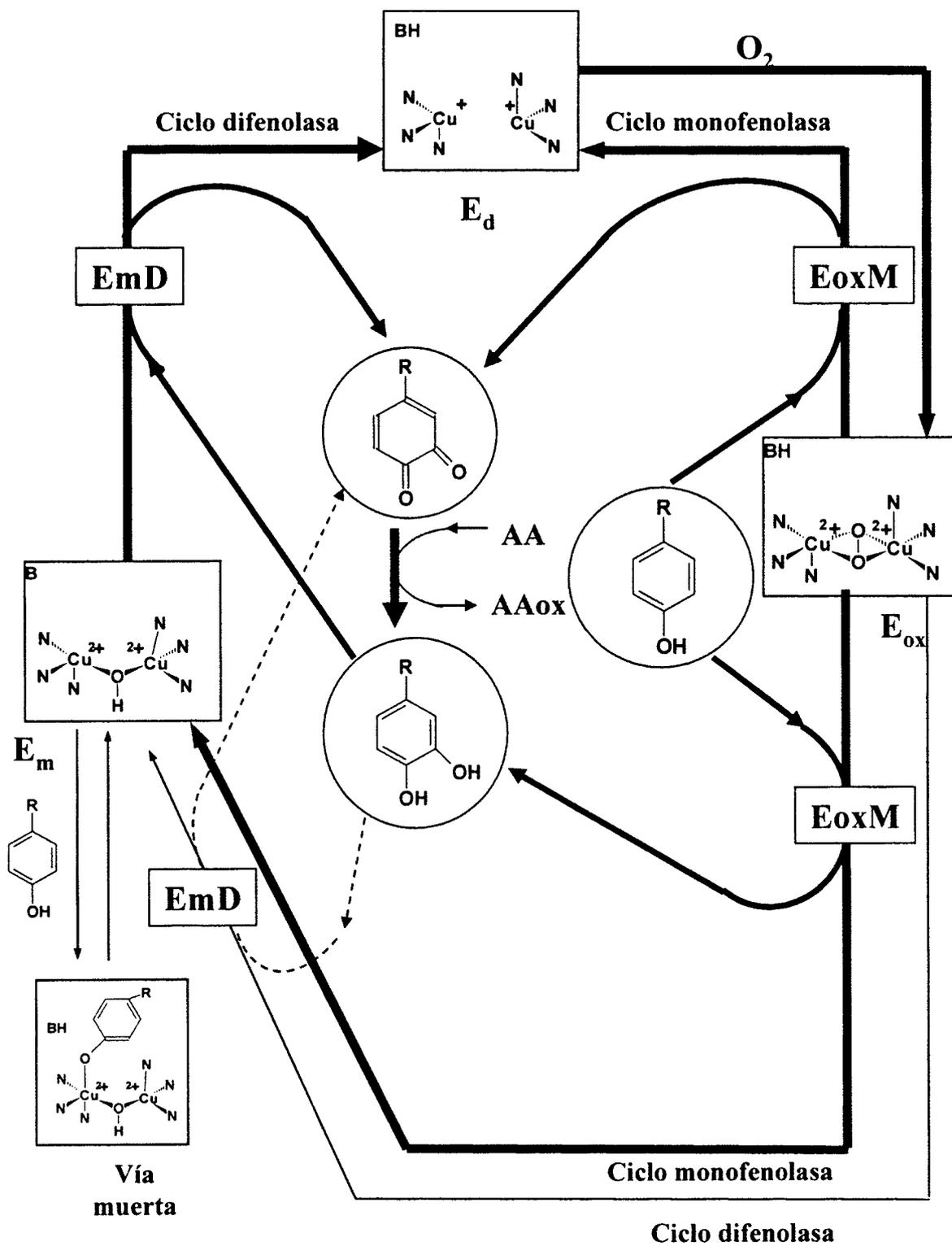


Figura 2

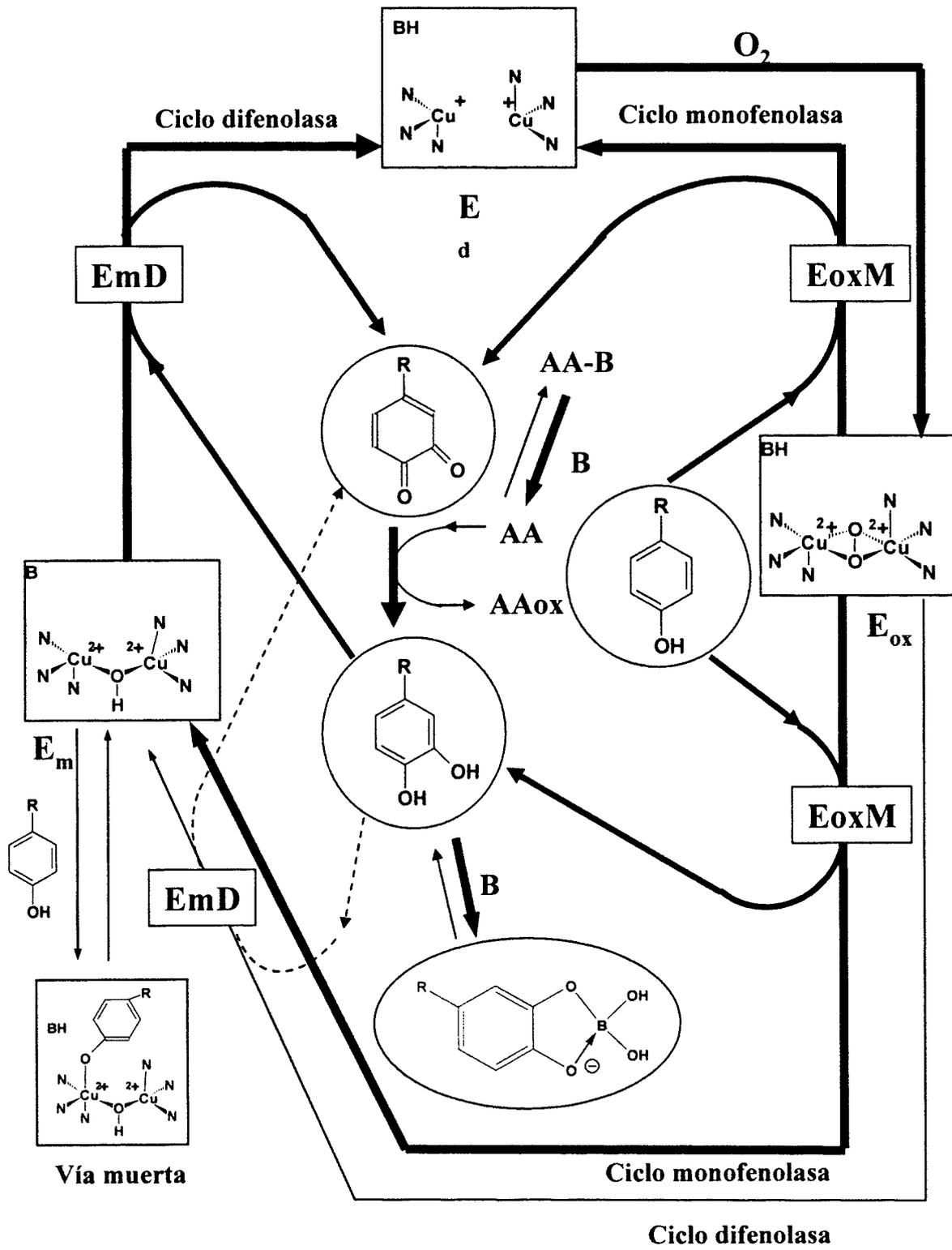


Figura 3

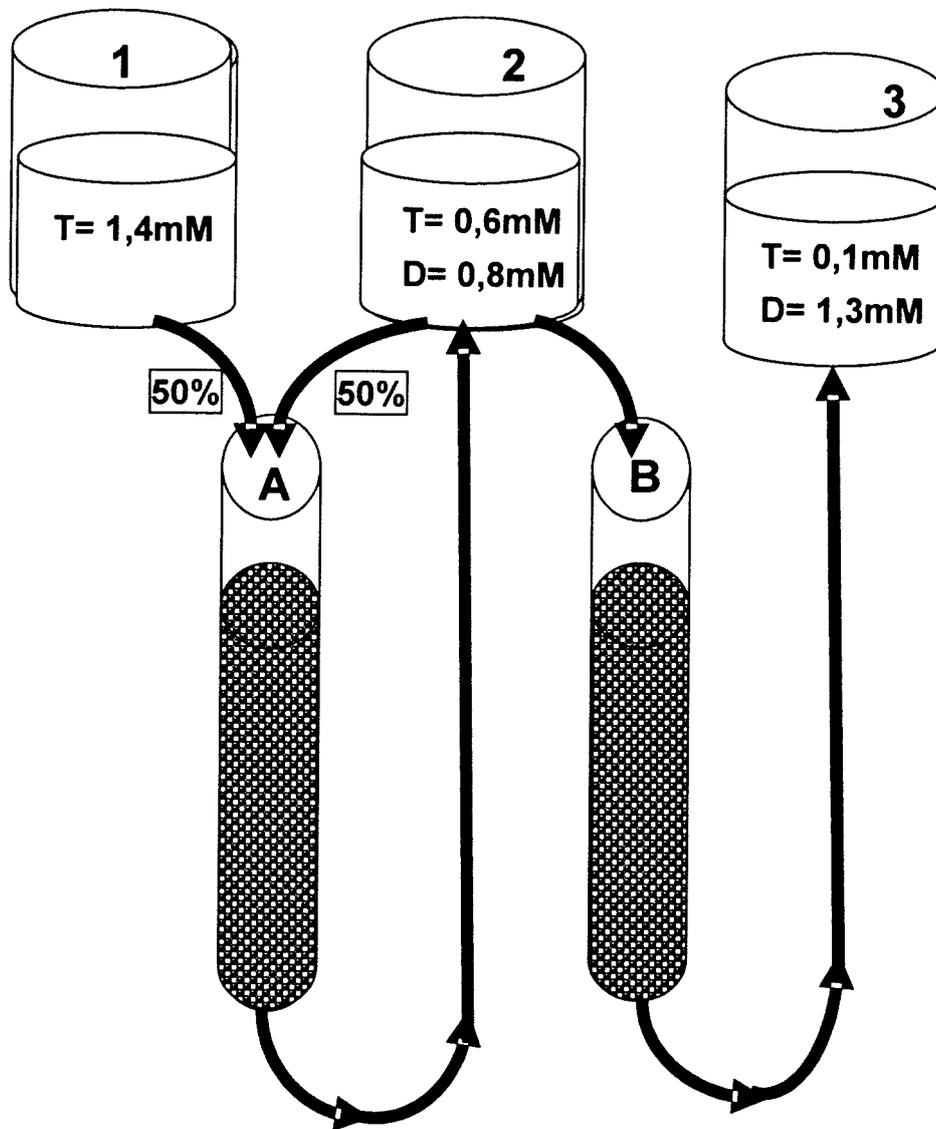


Figura 4. Esquema de la Obtención en flujo continuo con solo dos reactores



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 301 453

② Nº de solicitud: 200800436

③ Fecha de presentación de la solicitud: 18.02.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X Y	US 5122461 A (HSIUNG, K.-P. et al.) 16.06.1992, columna 5, líneas 14-23; columna 6, ejemplo 10.	1,2,4-6,9, 10 3,7,8
Y	YAMAZAKI, S. et al. "Kinetic Evaluation of Catalase and Peroxygenase Activities of Tyrosinase". Biochemistry, 2004, Volumen 43, páginas 11546-11553. Ver página 11550, columna 1.	3,7,8
X	CA 02572245 A (JENNISSEN, H. & MORPHOPLANT GMBH) 27.12.2006, página 14, ejemplo 2.	1,9,10
X	HWANG, D.S. et al. Cell adhesion biomaterial based on mussel adhesive protein fused with RGD peptide". Biomaterials, 2007, Volumen 28, páginas 4039-4046. Ver página 4041, apartado 2.6.	1,7,9,10
A	MARÍN-ZAMORA, M.E. et al. "Effects of the immobilization supports on the catalytic properties of immobilized mushroom tyrosinase: A comparative study using several substrates". Journal of Biotechnology, 2007, Volumen 131, páginas 388-396. Ver resumen.	4,5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 21.05.2008	Examinador G. Esteban García	Página 1/2
---	--	----------------------

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C 39/08 (2006.01)

C07C 229/36 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)