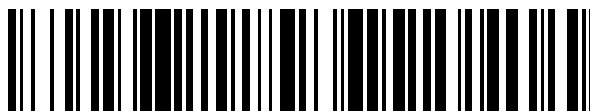


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 482 610**

51 Int. Cl.:

C12P 19/04 (2006.01)

C12P 19/18 (2006.01)

C07H 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2011 E 11738435 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2598645**

54 Título: **Procedimiento de producción de glucósidos de derivados de acrilato que emplean polisacáridos y glicosidasas o glicosiltransferasas**

30 Prioridad:

29.07.2010 EP 10171323

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

04.08.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KELLER, HARALD;
LOOS, KATJA y
KLOOSTERMAN, WOUTER**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 482 610 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de glucósidos de derivados de acrilato que emplean polisacáridos y glicosidasas o glicosiltransferasas

5 La invención se refiere a un procedimiento de producción de un glicósido etilénicamente insaturado haciendo reaccionar un compuesto etilénicamente insaturado con un polisacárido en presencia de una glicosidasa o una glicosiltransferasa.

10 Los polímeros que comprenden restos de azúcar (copolímeros sacarídicos) pueden compartir propiedades típicas de los sacáridos, tales como una buena solubilidad en agua, una alta estabilidad de los electrolitos, estabilidad coloidal en agua caliente, fuerte interacción con superficies tales como el algodón y ausencia de toxicidad. Estas propiedades específicas permiten diferentes aplicaciones para dichos polímeros. Por tanto, es de gran interés el desarrollo de procedimientos rentables de producción de copolímeros sacarídicos muy definidos y sus respectivos monómeros. Dichos monómeros pueden ser glicósidos etilénicamente insaturados polimerizables que se obtienen mediante el acoplamiento glicosídico de un sacárido y un alcohol etilénicamente insaturado. La síntesis de dichos glicósidos supone varios retos. Hay muchas posibilidades de formación de isómeros posicionales, en los que diferentes grupos hidroxilo del sacárido se ven involucrados en la formación de enlaces. Además, existe la posibilidad de que se produzca la formación de diferentes formas anoméricas. La síntesis química de la mayoría de monómeros portan restos de azúcar, por tanto, en general, no es factible y produce malos rendimientos del monómero deseado.

20 La aplicación de enzimas se ha considerado un enfoque alternativo para la producción de monómeros glicosídicos. En contraste con la síntesis química, las reacciones de azúcares no protegidos catalizadas por enzimas por lo general producen un producto estructuralmente mucho más homogéneo debido a su alta estereoselectividad.

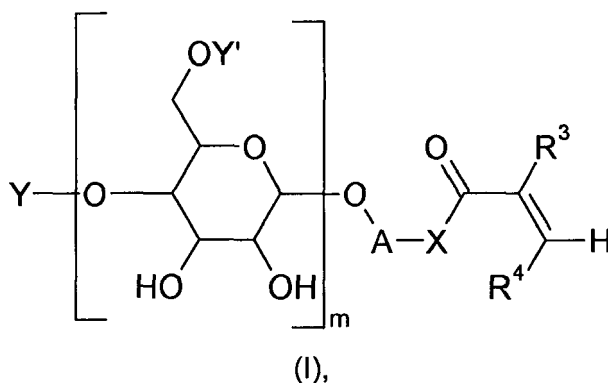
25 En general se usan dos enfoques para la síntesis enzimática de glicósidos: la hidrólisis inversa controlada termodinámicamente y la transglicosilación controlada cinéticamente. Enfoques para el uso de glicosidasas, que catalizan la hidrólisis *in vivo* de glicósidos, para la síntesis de glicósidos mediante hidrólisis inversa han sido descritos, por ejemplo, por I. Gill y R. Valivety (Angew. Chem. Int. Ed. 39(21):3804-3808, 2000). La transferencia de unidades glicosilo a compuestos distintos del azúcar con grupos hidroxilo primarios mediante transglicosilación catalizada enzimáticamente ha sido mostrada, por ejemplo, por S. Matsumura y col. (Makromol. Chem., Rapid Commun. 14:55-58, 1993).

30 El documento de YORK, W.S. & HAWKINS, R.: "Preparation of oligomeric β -glycosides from cellulose and hemicellulosic polysaccharides via the glycosyl transferase activity of a *Trichoderma reesei* cellulase" (GLYCOBIOLOGY, vol. 10, n° 2, 2000, páginas 193-201) desvela un procedimiento de producción de alquil glicósidos que comprende hacer reaccionar un alcohol aceptor con el polisacárido xiloglucano en presencia de la glicosidasa celulasa.

35 El documento de patente EP 0 394 496 A1 (31 de octubre de 1990; NIPPON FINE CHEMICAL CO., LTD.) desvela un procedimiento de producción de un glicósido etilénicamente insaturado maltotriosil etoxietil metacrilato que comprende hacer reaccionar químicamente el compuesto etilénicamente insaturado dietilenglicol metacrilato con metil D-maltotrióside.

40 Los polisacáridos, tales como la celulosa o el almidón, son baratos y están disponibles fácilmente. Por tanto era un objeto de la presente invención desarrollar un procedimiento de producción de glicósidos etilénicamente insaturados usando polisacáridos como fuente de unidades glicosilo.

Así, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de un glicósido etilénicamente insaturado de fórmula I



en la que

Y e Y' son independientemente H, o un monosacárido o un oligosacárido lineal o ramificado que comprende de 2 a 12 unidades de monosacárido, en la que al menos uno de Y e Y' es distinto de H;

m es un número entero de 0 a 3;

A es alquileo C₂₋₂₀ o -R⁶-O-[-R⁶-O-]_x-alquileo C₂₋₂₀;

5 X se selecciona del grupo que consiste en -O-, -NH- y -NR⁵-;

R³ se selecciona del grupo que consiste en -H, y alquilo C₁₋₁₀;

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en -H, -COOH y -COO-M⁺;

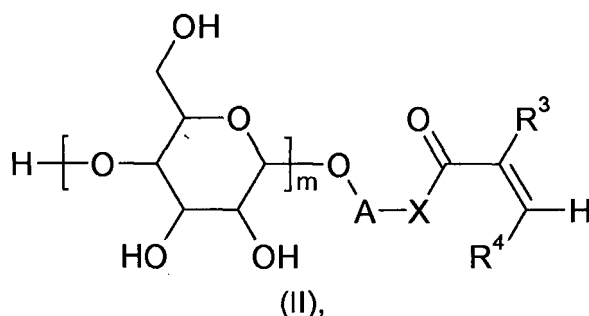
R⁵ es alquilo C₁₋₁₀;

R⁶ es -C₂H₄- o -C₃H₆-;

10 M⁺ se selecciona del grupo que consiste en Li⁺, Na⁺, K⁺ y NH₄⁺; y

x es un número entero de 0 a 200;

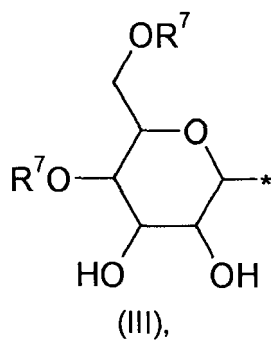
que comprende hacer reaccionar un compuesto etilénicamente insaturado de fórmula II



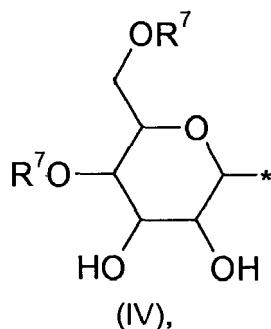
15 con un polisacárido que comprende 10 o más unidades de monosacárido en presencia de una glicosidasa o una glicosiltransferasa.

En realizaciones preferidas, Y' es H e Y es un monosacárido, o un oligosacárido lineal o ramificado que comprende de 2 a 12 unidades de monosacárido.

En realizaciones preferidas, Y es



20 en la que R⁷ es -H o un radical de fórmula IV:



en la que en unidades de monosacárido periféricas R⁷ es H.

Definiciones

25 El término "monosacárido" como se usa en el presente documento se refiere a una sola unidad de un polihidroxialdehído que forma un hemiacetal intramolecular, cuya estructura incluye un anillo de seis miembros de

cinco átomos de carbono y un átomo de oxígeno. Los monosacáridos pueden estar presentes en diferentes formas diastereoméricas, tales como anómeros α o β , e isómeros D o L. Un "oligosacárido" consiste en cadenas cortas de unidades de monosacáridos unidas covalentemente. Los oligosacáridos comprenden disacáridos que incluyen unidades de dos monosacáridos, así como trisacáridos que incluyen unidades de tres monosacáridos. Un "polisacárido" consiste en cadenas largas de unidades de monosacárido unidas covalentemente.

El término "enlace glicosídico" o "unión glicosídica" es un tipo de unión o enlace químico formado entre el grupo hidroxilo anomérico de un sacárido o derivado de sacárido (glicona) y el grupo hidroxilo de otro sacárido o de un compuesto orgánico no sacarídico (aglicona) tal como un alcohol. El extremo reductor del di- o polisacárido se encuentra hacia el último carbono anomérico de la estructura, y el extremo terminal está en dirección opuesta.

Un procedimiento "catalizado enzimáticamente" o "biocatalítico" como se usa en el presente documento significa que dicho procedimiento se lleva a cabo bajo la acción catalítica de una enzima, en particular de una glicosidasa o una glicosiltransferasa. El procedimiento se puede llevar a cabo en presencia de dicha glicosidasa o glicosiltransferasa en forma aislada (purificada, enriquecida) o en bruto.

El término "glicosidasa" también incluye variantes, mutantes o partes enzimáticamente activas de glicosidasas.

Asimismo, el término "glicosiltransferasa" también incluye variantes, mutantes o partes enzimáticamente activas de glicosiltransferasas.

Las cantidades catalíticas de enzima se expresan en "U" ("Unidad" o "unidad"), en la que 1 U equivale a la cantidad de enzima que cataliza la reacción de 1 μmol de sustrato por minuto en condiciones específicas (por lo general 37 $^{\circ}\text{C}$ y pH 7,5). Así, por ejemplo, 10 U de glicosidasa equivalen a una cantidad catalítica de enzima necesaria para la reacción de 10 μmol de sustrato sacarídico por minuto. Las cantidades catalíticas de amilasa maltogénica se pueden expresar en "UNAM" (unidad de nueva amilasa maltogénica), en la que 1 UNAM equivale a la cantidad catalítica de enzima necesaria para la reacción de 1 μmol de maltotriosa por minuto en condiciones estándar (10 mg/ml de maltotriosa, 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 5,0, tiempo de reacción de 30 minutos). La cantidad catalítica de una enzima se puede determinar por procedimientos muy conocidos en la técnica.

El término "alquilo" comprende radicales alquilo C_{1-10} que son radicales lineales o ramificados que tienen entre 1 y 10 átomos de carbono. Sus ejemplos incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, 2-butilo, isobutilo o terc-butilo, pentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, hexilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1-etil-1-metilpropilo, 1-etil-2-metilpropilo, heptilo, octilo, nonilo, y decilo, así como sus isómeros constitutivos tales como 2-etilhexilo.

El término "alquileo" comprende dirradicales de alquileo C_{2-20} que son dirradicales lineales o ramificados que tienen entre 1 y 20 átomos de carbono.

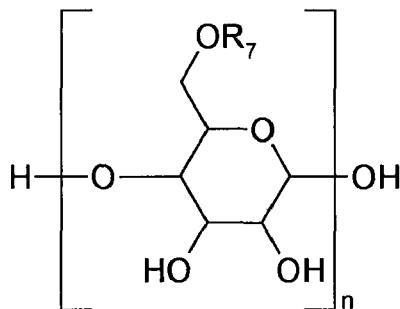
El término "etilénicamente insaturado" se refiere a un compuesto que comprende un doble enlace $\text{C}=\text{C}$ no aromático. Específicamente, un "glicósido etilénicamente insaturado" como se usa en el presente documento se refiere a un glicósido que consiste en un sacárido que está unido glicosídicamente a un alcohol etilénicamente insaturado.

En el procedimiento de la presente invención, el polisacárido actúa como fuente de unidades de sacárido que se transfieren a un compuesto etilénicamente insaturado de fórmula II para formar el glicósido etilénicamente insaturado de fórmula I. Las unidades de sacárido transferidas son unidades de monosacárido tales como unidades de glucosa, galactosa, o manosa; unidades de disacáridos tales como unidades de maltosa, lactosa o celobiosa; unidades de trisacáridos tales como unidades de maltotriosa; u otras unidades de oligosacáridos tales como maltohexaosa, o una de sus mezclas. Por ejemplo, las unidades de sacárido transferidas son unidades de D-glucosa, maltosa, celobiosa, maltotriosa, o maltohexaosa. Las unidades de oligosacáridos transferidas pueden ser lineales o ramificadas.

El polisacárido usado en el procedimiento de la presente invención comprende 10 o más unidades de monosacárido. Por lo general, el número de unidades de monosacárido del polisacárido está entre 300 aproximadamente y 200.000 aproximadamente, por ejemplo, entre 2000 aproximadamente y 200.000 aproximadamente; entre 300 aproximadamente y 3000 aproximadamente; o entre 300 aproximadamente y 10.000 aproximadamente. El tamaño de los polisacáridos, es decir, el número de unidades monoméricas, se puede reducir mediante preprocesamiento, por ejemplo, usando ácido y/o calor o enzimas tales como α -amilasas. Los polisacáridos pueden ser cadenas lineales de unidades no sacarídicas unidas mediante enlaces glicosídicos (1 \rightarrow 4); o pueden estar ramificadas mediante la formación de enlaces glicosídicos (1 \rightarrow 6); por ejemplo, cada 24 a 30 unidades monoméricas. Las unidades de monosacárido terminales de la cadena sacarídica (y las cadenas laterales) también se denominan en el presente documento unidades de monosacáridos periféricos.

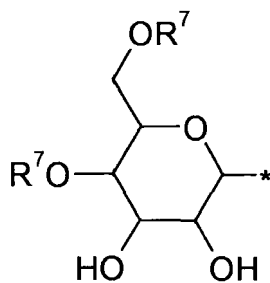
55

En particular, el polisacárido puede ser un compuesto de fórmula V



(V),

en la que R^7 es -H o un radical de fórmula VI:



(VI),

- 5 en la que en unidades de monosacárido periféricas R^7 es H y n es tal que el número de unidades de monosacárido englobadas por las unidades recurrentes entre corchetes es de 10 o superior, por ejemplo, entre 300 aproximadamente y 200.000 aproximadamente.

Polisacáridos ejemplares comprenden almidón, amilosa, amilopectina, celulosa, y sus mezclas.

- 10 En una realización, m es 0, es decir, el compuesto etilénicamente insaturado de fórmula II es un alcohol etilénicamente insaturado seleccionado entre hidroxialquil (met)acrilatos, N-hidroxialquil (met)acrilamidas, mono (hidroxialquil) ésteres del ácido maleico, y sus sales; o uno de sus derivados etoxilados, propoxilados, o etoxilados y propoxilados.

- 15 En otras realizaciones, m es 1, 2 o 3, es decir, el compuesto etilénicamente insaturado de fórmula II es un mono-, di- o triglicósido etilénicamente insaturado que consiste en un componente mono-, di- o trisacarídico y un componente alcohólico seleccionado entre los alcoholes etilénicamente insaturados anteriores.

Los alcoholes etilénicamente insaturados preferidos de fórmula II se seleccionan entre 2-hidroxietil acrilato, 2-hidroxietil metacrilato, 3-hidroxipropil acrilato, 3-hidroxipropil metacrilato, N-(2-hidroxietil) acrilamida, N-(2-hidroxietil) metacrilamida, N-(3-hidroxipropil) acrilamida, N-(3-hidroxipropil) metacrilamida, (2-hidroxietil) hidrogenomaleato, y sus glicósidos.

- 20 En ciertas realizaciones, A es alquileo C_{2-6} , X es -O-, y R^3 es -H o -CH₃.

En realizaciones adicionales, m es 1, Y' es H e Y es un monosacárido o un oligosacárido lineal o ramificado que comprende entre 2 y 12 unidades de monosacárido, y preferentemente es un monosacárido, un disacárido o un trisacárido.

- 25 En el procedimiento de la presente invención, la reacción del polisacárido y el alcohol o glicósido etilénicamente insaturado está catalizada por una enzima seleccionada entre una glicosidasa y una glicosiltransferasa. Por lo general, las enzimas muestran una alta especificidad en lo relativo a las reacciones que catalizan y a los sustratos que están involucrados en estas reacciones.

- 30 Las glicosidasas, un tipo de enzimas también conocidas como glicósido hidrolasas, son enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de compuestos O- y S-glicósídicos. Además, las glicosidasas se pueden usar para catalizar la formación de enlaces glicósídicos mediante hidrólisis inversa, en donde se invierte la posición de equilibrio de la reacción, o transglicosilación, en donde un resto glicósido se transfiere de un glicósido, es decir, el glicósido donador, a otro glicósido, es decir, el glicósido aceptor, para formar un nuevo glicósido. Las glicosidasas tienen asignado el número de clasificación de enzimas EC 3.2.1.x.

- Las glicosiltransferasas son enzimas capaces de catalizar la transglicosilación, una reacción en la que se transfiere un resto glicósido desde un glicósido, es decir, el glicósido donador, a otro glicósido, es decir, el glicósido aceptor, para formar un nuevo glicósido. Las glicosiltransferasas comprenden hexosiltransferasas que catalizan una transglicosilación en la que el resto glicósido transferido es una hexosa. Las hexosiltransferasas tienen asignado el número de clasificación de enzimas EC 2.4.1.x.
- La enzima se puede usar en forma purificada, en forma de concentrado enriquecido o como preparación enzimática en bruto.
- De forma conveniente, la glicosidasa presente en el procedimiento de la invención se selecciona del grupo constituido por amilasas, celulasas, glicosidasas y galactosidasas.
- La α -amilasa es una enzima que tiene el número de clasificación de enzimas CE 3.2.1.1, y también se conoce como glicogenasa, endoamilasa, Taka-amilasa A, o 1,4- α -D-glucanglucanohidrolasa. Las α -amilasas son capaces de catalizar la endohidrólisis de enlaces (1 \rightarrow 4)- α -D-glucosídicos en polisacáridos, que contienen tres o más unidades de D-glucosa unidas en (1 \rightarrow 4)- α , tales como el almidón y el glucógeno, liberando así grupos reductores en configuración α .
- La β -amilasa es una enzima que tiene asignado el número de clasificación de enzimas EC 3.2.1.2, y también se conoce como amilasa sacarógena, glicogenasa, o 1,4- α -D-glucano maltohidrolasa. Las β -amilasas son capaces de catalizar la hidrólisis de enlaces (1 \rightarrow 4)- α -D-glucosídicos en polisacáridos, tales como el almidón y el glucógeno liberando así unidades sucesivas de β -maltosa de los extremos no reductores de las cadenas de polisacáridos.
- La celulasa es una enzima que tiene asignado el número de clasificación de enzimas EC 3.2.1.4, y también se conoce como endo-1,4- β -D-glucanasa, β -1,4-glucanasa, β -1,4-endoglucano hidrolasa, celuasa A, celulosina AP, endoglucanasa D, celulasa alcalina, celulasa A3, celudextrinasa, 9.5 celulasa, avicelasa, pancelasa SS, o 1,4-(1,3;1,4)- β -D-glucano 4-glucanohidrolasa. Las celulasas son capaces de catalizar la endohidrólisis de enlaces (1 \rightarrow 4)- β -D-glucosídicos en celulosa, liquenina y β -D-glucanos de cereales, así como enlaces 1,4 en β -D-glucanos que también contienen enlaces 1,3.
- La α -glucosidasa es una enzima que tiene asignado el número de clasificación de enzimas EC 3.2.1.20, y también se conoce como maltasa, glucoinvertasa, glucosidosacarasa, maltasa-glucoamilasa, α -glucopiranosidasa, glucosidoinvertasa, α -D-glucosidasa, α -glucósido hidrolasa, o α -1,4-glucosidasa. Las α -glucosidasas son capaces de catalizar la hidrólisis de restos de α -D-glucosa terminales no reductores unidos en (1 \rightarrow 4) liberando así α -D-glucosa.
- La β -glucosidasa es una enzima que tiene asignado el número de clasificación de enzimas EC 3.2.1.21, y también se conoce como gentiobiasa, celobiasa, emulsina, elaterasa, aril- β -glucosidasa, β -D-glucosidasa, β -glucósido glucohidrolasa, arbutinasa, amigdalinas, p-nitrofenil- β -glucosidasa, primeverosidasa, amigdalasa, limarasa, salicilinas, o β -1,6-glucosidasa. Las β -glucosidasas son capaces de catalizar la hidrólisis de restos de α -D-glucosilo terminales no reductores liberando así β -D-glucosa.
- La α -galactosidasa es una enzima que tiene asignado el número de clasificación de enzimas EC 3.2.1.22, y también se conoce como melibiasa, α -D-galactosidasa, α -galactosidasa A, o α -galactósido galactohidrolasa. Las α -galactosidasas son capaces de catalizar la hidrólisis de restos de α -D-galactosa terminales no reductores en α -D-galactósidos, incluidos los oligosacáridos de galactosa, y los galactomananos.
- La β -galactosidasa es una enzima que tiene asignado el número de clasificación de enzimas EC 3.2.1.23, y también se conoce como lactasa, β -lactosidasa, maxilact, hydrolact, β -D-lactosidasa, S 2107, Lactozym, trilactasa, β -D-galactanasa, oryztym, o sumiklat. Las β -galactosidasas son capaces de catalizar la hidrólisis de restos de α -D-galactosa terminales no reductores en β -D-galactósidos.
- La glicosiltransferasa presente en el procedimiento de la invención puede ser una glicosiltransferasa tal como una hexosiltransferasa, por ejemplo ciclomaltodextrina glucanotransferasa o dextransacarasa.
- La ciclomaltodextrina glucanotransferasa es una enzima que tiene asignado el número de clasificación de enzimas EC 2.4.1.19, y también se conoce como amilasa de *Bacillus macerans*, ciclodextrina glucanotransferasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, ciclomaltodextrina glucotransferasa, ciclomaltodextrina glicosiltransferasa, konchizaimu, α -1,4-glucano 4-glicosiltransferasa de ciclación, BMA, CGTasa, ciclodextrina glicosiltransferasa neutra, o 1,4- α -D-glucano 4- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferasa. Las ciclomaltodextrina glucanotransferasas son capaces de catalizar la hidrólisis y la formación de enlaces (1 \rightarrow 4)- α -D-glucosídicos, y, en particular, la formación de maltodextrinas cíclicas a partir de polisacáridos, así como la desproporción de oligosacáridos lineales.
- La dextransacarasa es una enzima que tiene asignado el número de clasificación de enzimas EC 2.4.1.5, y también se conoce como sacarosa 6-glicosiltransferasa, SGE, CPA, sacarosa-1,6- α -glucano glicosiltransferasa o sacarosa-1,6- α -D-glucano 6- α -D-glicosiltransferasa. Las dextransacarasas son capaces de catalizar la reacción: sacarosa + [(1 \rightarrow 6)- α -D-glucosil]_n = D-fructosa + [(1 \rightarrow 6)- α -D-glucosil]_{n+1}.

La enzima se puede disolver en la mezcla de reacción o se puede inmovilizar sobre un soporte sólido que está en contacto con la mezcla de reacción. Si la enzima esté movilizada, se encuentra unida a un vehículo inerte. Los materiales de vehículos adecuados son conocidos en la técnica. Los ejemplos de dichos materiales adecuados como vehículos son arcillas, minerales de arcilla, tales como caolinita, tierra de diatomeas, perlita, sílice, alúmina, carbonato sódico, carbonato de calcio, polvo de celulosa, materiales intercambiadores de aniones, polímeros sintéticos, tales como poliestireno, resinas acrílicas, resinas de fenol formaldehído, poliuretanos y poliolefinas, tales como polietileno y polipropileno. Para la preparación de enzimas unidas a vehículos, los materiales de vehículo normalmente se usan en forma de polvos finos, en donde se prefieren las formas porosas. El tamaño de partícula del material de vehículo por lo general no supera los 5 mm, en particular los 2 mm. Además, los materiales de vehículo adecuados son alginato de calcio y carragenano. Las enzimas pueden estar unidas directamente mediante glutaraldehído. En la técnica se conocen una amplia variedad de procedimientos de inmovilización (por ejemplo, J. Lalonde y A. Margolin "Immobilization of Enzymes" en K. Drauz y H. Waldmann, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis 2002, Vol.III, 991-1032, Wiley-VCH, Weinheim).

La reacción catalizada enzimáticamente se puede llevar a cabo en forma discontinua, semi-continua o en forma continua. Los reactivos se pueden suministrar al comienzo de la reacción o se pueden suministrar posteriormente, bien de forma semi-continua o de forma continua. La cantidad catalítica de glicosidasa o glicosiltransferasa necesaria para el procedimiento de la invención depende de las condiciones de reacción, tales como la temperatura, los disolventes y la cantidad de sustrato.

La reacción se puede llevar a cabo en un medio acuoso tal como un tampón. Un tampón ajusta el pH de la mezcla de reacción a un valor adecuado para una catálisis enzimática eficaz. Por lo general el pH está en el intervalo de pH 4 aproximadamente a pH 9 aproximadamente, por ejemplo de pH 5 aproximadamente a pH 7 aproximadamente. Los tampones adecuados comprenden, pero no están limitados a, acetato sódico, tris (hidroximetil) aminometano ("Tris") y tampones fosfato.

Opcionalmente, la reacción tiene lugar en presencia de una mezcla disolvente de agua y un disolvente orgánico miscible en agua a una relación ponderal de agua a disolvente orgánico de entre 0,1:1 y 9:1, por ejemplo, entre 1:1 y 3:1. El disolvente orgánico no es un alcohol primario o secundario y, en consecuencia, no es reactivo con el polisacárido. Los disolventes orgánicos adecuados comprenden alcanonas, alquilnitrilos, alcoholes terciarios y éteres cíclicos, y sus mezclas, por ejemplo, acetona, acetonitrilo, t-pentanol, t-butanol, 1,4-dioxano y tetrahidrofurano, y sus mezclas. En general, no es preferible el uso de disolventes orgánicos.

Un "disolvente miscible en agua" se entiende que pretende significar un disolvente orgánico que forma una mezcla homogénea con agua a la relación ponderal usada de agua a disolvente orgánico.

La concentración y la relación de los reactivos, es decir, el polisacárido y el compuesto etilénicamente insaturado de fórmula II, se pueden adaptar a las condiciones óptimas de reacción. Por ejemplo, la concentración inicial de polisacárido puede estar en el intervalo de 10 a 400 g/l, con respecto al volumen total de la mezcla de reacción, por ejemplo, 50 g/l.

La temperatura de reacción se puede adaptar a las condiciones óptimas de reacción, que pueden depender de la enzima específica aplicada. La reacción puede tener lugar de forma conveniente a temperaturas entre el punto de congelación de la mezcla de reacción y la temperatura de desnaturalización de la enzima. Tras alcanzar la temperatura de desnaturalización se pierde la actividad catalítica de la enzima. Por ejemplo, la reacción se puede llevar a cabo a una temperatura en el intervalo de 0 °C a 80 °C, por ejemplo, de 30 °C a 65 °C.

El procedimiento puede continuar hasta que se alcance el equilibrio entre los reactivos y los productos, pero se puede detener antes. Los tiempos de procesamiento habituales están en el intervalo de 1 h a 96 h.

La metodología de la presente invención además puede comprender una etapa de recuperación del glicósido etilénicamente insaturado producido de fórmula I. El término "recuperación" incluye la extracción, recolección, aislamiento o purificación del compuesto a partir de la mezcla de reacción. La recuperación del compuesto se puede llevar a cabo de acuerdo con cualquier metodología de aislamiento o purificación convencional conocida en la técnica, que incluye, pero no está limitada, el tratamiento con una resina convencional (por ejemplo, una resina de intercambio de aniones o cationes, una resina de adsorción no iónica, etc.), el tratamiento con un adsorbente convencional (por ejemplo, carbono activado, ácido silícico, gel de sílice, celulosa, alúmina, etc.), la alteración del pH, la extracción del disolvente (por ejemplo, con un disolvente convencional tal como un alcohol, acetato de etilo, hexano y similares), destilación, diálisis, filtración, concentración, cristalización, recristalización, ajuste del pH, liofilización y similares.

La identidad y pureza del producto aislado se pueden determinar mediante técnicas conocidas, tal como cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de gases (GC), espectroscopía (por ejemplo, espectroscopía IR, UV y RMN), procedimientos colorimétricos, NIRS, o ensayos enzimáticos.

Los ejemplos descritos a continuación están concebidos para ilustrar la presente invención.

Ejemplo 1: Síntesis de 2-(β-glucosiloxi)-etil acrilato catalizada por celulasa a partir de celulosa

Se suspendieron 0,5 g de celulosa en 10 ml de tampón de acetato sódico 50 mM a pH 5,0 que contiene 1 ml de 2-hidroxietil acrilato. La reacción se inició mediante la adición de 0,010 g (60 U) de celulasa de *Trichoderma reesei*. La mezcla de reacción se agitó durante 3 días a 37 °C. El producto se detectó mediante cromatografía de capa fina (TLC) (cloroformo/metanol 4/1 (v/v), Rf 0,55). La celulosa sin reaccionar se retiró por filtración y el producto se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, eluyente: cloroformo/metanol 7/1 (v/v)). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y el disolvente se retiró por evaporación rotatoria. Rendimiento: 9,4 mg (2% del total de celulosa).

RMN ¹H δ en ppm: 3,2-4,2 GlucOCH₂CH₂R (8p); 4,38 GlucOCH₂CH₂R (2p Tri J 4,38 4,38 Hz); 4,50 GlucH₁ (1p Dob J 7,92 Hz); 5,99 H_{trans} CH=CHR (1p Dob J 10,42 Hz); 6,22 CH₂=CHR (1p DDob J 17,30 10,47 Hz); 6,46 H_{cis} CH=CHR (1p Dob J 17,31 Hz)

RMN ¹³C δ en ppm: 60,9 GlucC₆; 64,4 OCH₂CH₂; 68,1 OCH₂CH₂; 69,8 GlucC₅; 73,3 GlucC₂; 75,9 GlucC₃; 76,1 GlucC₄; 102,7 GlucC_{1β}; 127,6 H₂C=CHR; 132,9 H₂C=CHR; 168,6 O(O)CR

ESI-MS pos: calculado: 301,09 (C₁₁H₁₈O₈Na); observado: 301,25

Ejemplo 2: Síntesis de 2-(α-maltosiloxi)-etil acrilato catalizada por amilasa a partir de almidón

Se suspendieron 5,0 g de almidón soluble en 50 ml de tampón de acetato sódico 50 mM a pH 5,0 que contiene 50 ml de 2-hidroxietil acrilato. La reacción se inició con la adición de 10 ml (32.000 UNAM) de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus*. La mezcla de reacción se agitó durante 4 días a 55 °C. El producto se detectó por TLC (cloroformo/metanol 2/1 (v/v), Rf 0,45). El 2-hidroxietil acrilato restante se retiró mediante extracción con dietiléter. La capa acuosa se concentró por evaporación rotatoria a 30 °C. El almidón sin reaccionar se precipitó en isopropanol y se separó por filtración. El filtrado se concentró por evaporación rotatoria a 30 °C y el producto se purificó adicionalmente por cromatografía en columna (gel de sílice, eluyente: cloroformo/metanol 3/1 (v/v)). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y el disolvente se retiró por evaporación rotatoria. Rendimiento: 0,408 g (8%) Pureza: > 85%

RMN ¹H δ en ppm: 3,2-4,2 Gluc₁₋₂ OCH₂CH₂R (14p); 4,38-4,50 GlucOCH₂CH₂R (2p); 4,96 Gluc₁ H₁ (1p Dob J 3,75 Hz); 5,35 Gluc₂ H₁ (1p Dob J 3,76 Hz); 5,99 H_{trans} CH=CHR (1p Dob J 10,43 Hz); 6,21 CH₂=CHR (1p DDob J 17,29 10,45 Hz); 6,44 H_{cis} CH=CHR (1p Dob J 17,30 Hz)

RMN ¹³C δ en ppm: 60,6 Gluc₂ C₆; 63,5 Gluc₁ C₆; 64,1 OCH₂CH₂; 67,7 OCH₂CH₂; 69,5 Gluc₁ C₅; 71,2 Gluc₂ C₅; 72,0 Gluc₁ C₂; 72,9 Gluc₁ C₃; 73,1 Gluc₂ C₃; 73,6 Gluc₂ C₂; 76,3 Gluc₁ C₄; 77,5 Gluc₂ C₄; 98,2 Gluc₁ C_{1α}; 100,1 Gluc₂ C_{1β}; 127,7 H₂C=CHR; 132,8 H₂C=CHR; 168,6 O(O)CR

ESI-MS pos: calculado: 463,1422 (C₁₇H₂₈O₁₃Na); observado: 463,3333

Ejemplo 3: Síntesis de 2-(β-maltosiloxi)-etil acrilato catalizada por ciclodextrina glicosiltransferasa a partir de almidón

Se disolvieron 0,634 g de 2-(β-glucosiloxi)-etil acrilato y 1,0 g de almidón soluble en 10 ml de tampón Tris-HCl a pH 7,0 que contiene cloruro de calcio 0,01 M y 0,004 g de MEHQ. La reacción se inició con la adición de 0,1 ml (60 U) de ciclodextrina glicosiltransferasa procedente de *Bacillus macerans*. La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h a 60 °C. El producto se detectó por TLC (acetónitrilo/agua/amoniaco 6/3/1 (v/v), Rf 0,27) y se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, eluyente: acetato de etilo/metanol 4/1 (v/v)). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y el disolvente se retiró por evaporación rotatoria. Producto: α-D-glucopiranosil-(1-4)-α-D-glucopiranosil-(1-4)-β-glucopiranosil-oxietil acrilato. Rendimiento: 0,241 g (38% en peso) Pureza: 95%

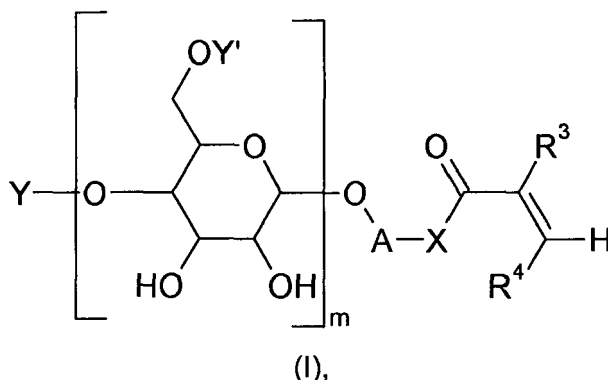
RMN ¹H δ en ppm: 3,2-4,2 Gluc₁₋₃ OCH₂CH₂R (20p); 4,39 GlucOCH₂CH₂R (2p Tri J 4,38 4,38 Hz); 4,50 Gluc₁ H₁ (1p Dob J 7,91 Hz); 5,39 Gluc₂₋₃ H₁ (2p Sin) 5,99 H_{trans} CH=CHR (1p Dob J 10,46 Hz); 6,22 CH₂=CHR (1p DDob J 17,29 10,46 Hz); 6,46 H_{cis} CH=CHR (1p Dob J 17,30 Hz)

RMN ¹³C δ en ppm: 60,7 Gluc₂₋₃ C₆; 60,8 Gluc₁ C₆; 64,4 OCH₂CH₂; 68,1 OCH₂CH₂; 69,5 Gluc₁ C₅; 71,4 Gluc₂ C₅; 71,7 Gluc₃ C₅; 72,0 Gluc₁ C₂; 72,9 Gluc₁ C₃; 73,1 Gluc₂₋₃ C₃; 73,5 Gluc₂ C₂; 74,8 Gluc₃ C₂; 76,3 Gluc₁ C₄; 77,0 Gluc₂ C₄; 77,1 Gluc₃ C₄; 99,7 Gluc₃ C_{1α}; 100,0 Gluc₂ C_{1α}; 102,5 Gluc₁ C_{1β}; 127,6 H₂C=CHR; 132,9 H₂C=CHR; 168,7 O(O)CR

ESI-MS pos: calculado: 625,1950 (C₂₃H₃₈O₁₈Na); observado: 625,1957

REIVINDICACIONES

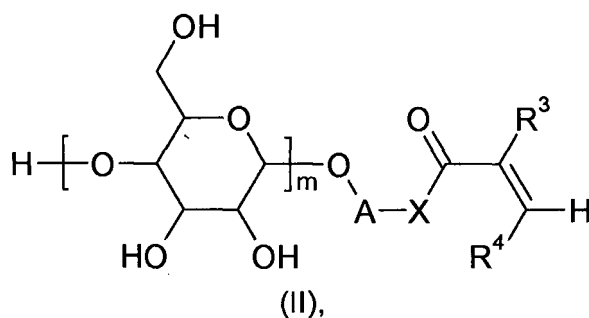
1. Un procedimiento de producción de un glicosilo etilénicamente insaturado de fórmula I



en la que

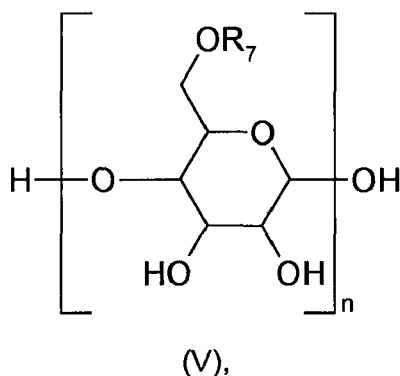
- 5 Y e Y' son independientemente H, o un monosacárido o un oligosacárido lineal o ramificado que comprende de 2 a 12 unidades de monosacárido, en la que al menos uno de Y e Y' es distinto de H;
 m es un número entero de 0 a 3;
 A es alquileo C₂₋₂₀ o -R⁶-O-[-R⁶-O-]_x-alquileo C₂₋₂₀;
 X se selecciona del grupo que consiste en -O-, -NH- y -NR⁵-;
 10 R³ se selecciona del grupo que consiste en -H, y alquilo C₁₋₁₀;
 R⁴ se selecciona del grupo que consiste en -H, -COOH y -COO-M⁺;
 R⁵ es alquilo C₁₋₁₀;
 R⁶ es -C₂H₄- o -C₃H₆-;
 M⁺ se selecciona del grupo que consiste en Li⁺, Na⁺, K⁺ y NH₄⁺; y
 15 x es un número entero de 0 a 200;

que comprende hacer reaccionar un compuesto etilénicamente insaturado de fórmula II

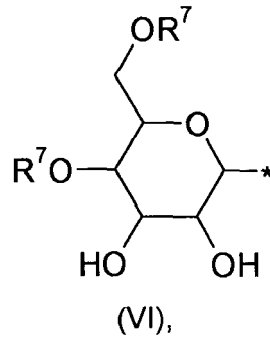


con un polisacárido que comprende 10 o más unidades de monosacárido en presencia de una glicosidasa o una glicosiltransferasa.

20 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polisacárido es un compuesto de fórmula III:



en la que R⁷ es -H o un radical de fórmula VI:



en la que en unidades de monosacárido periféricas R^7 es H y n es tal que el número de unidades de monosacárido englobadas por las unidades recurrentes en los corchetes es de 10 o superior.

3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que Y' es H.
- 5 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que
A es alquileo C_{2-6} ;
X es -O-; y
 R^3 es -H, o - CH_3 ;
- 10 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que
m es 1; e
Y se selecciona del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos y trisacáridos.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la glicosidasa se selecciona del grupo que consiste en amilasas, celulasas, glicosidasas y galactosidasas.
- 15 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la glicosiltransferasa se selecciona del grupo que consiste en ciclomaltodextrina glucanotransferasas.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el polisacárido se selecciona del grupo que consiste en almidón, amilosa, amilopectina, celulosa, y sus mezclas.