

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 832**

51 Int. Cl.:

C12P 19/44 (2006.01)

C07H 15/10 (2006.01)

C07H 99/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2011 E 11735656 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2598647**

54 Título: **Procedimiento de producción de glicósidos de derivados de acrilato empleando sacáridos y glicosidasas**

30 Prioridad:

29.07.2010 EP 10171322

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

30.12.2014

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 2 525 832 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 glicósidos de derivados de acrilato empleando sacáridos y glicosidasas

La invención se refiere a un procedimiento de producción de un glicósido etilénicamente insaturado haciendo reaccionar un alcohol etilénicamente insaturado con un sacárido en presencia de una glicosidasa.

5 Los polímeros que comprenden residuos de azúcar (copolímeros de sacáridos) pueden compartir propiedades típicas de los sacáridos, tales como buena solubilidad en agua, alta estabilidad de electrolito, estabilidad coloidal en agua caliente, fuerte interacción con superficies tales como algodón, y no toxicidad. Estas propiedades específicas abren una diversidad de aplicaciones para dichos polímeros. Por lo tanto, es muy importante el desarrollo de procedimientos rentables para la producción de copolímeros de sacáridos bien definidos y sus respectivos monómeros. Dichos monómeros pueden ser
10 glicósidos polimerizables etilénicamente insaturados que son el resultado de un acoplamiento glicosídico de un sacárido y un alcohol etilénicamente insaturado. La síntesis de dichos glicósidos implica una serie de desafíos. Hay muchas posibilidades de formación de isómeros de posición, en los que diferentes grupos hidroxilo del sacárido se ven implicados en la formación de enlaces. Además, existe el potencial de formación de formas anoméricas diferentes. Por lo tanto, la síntesis química de la mayoría de los monómeros con residuos de azúcar no es factible, en general, y resulta en bajos rendimientos del monómero deseado.
15

La aplicación de enzimas ha sido considerada como un enfoque alternativo para la producción de monómeros glicosídicos. En contraste con la síntesis química, las reacciones catalizadas por enzimas de azúcares no protegidos normalmente producen un producto mucho más homogéneo, en términos estructurales, debido a su alta estereoselectividad.

20 En general, hay dos enfoques usados para la síntesis enzimática de glicósidos: hidrólisis inversa controlada termodinámicamente y transglicosilación controlada cinéticamente. La transferencia de unidades glicosilo a compuestos sin azúcar con grupos hidroxilo primarios mediante transglicosilación catalizada enzimáticamente ha sido demostrada, por ejemplo, por S. Matsumura et al. (Makromol. Chem., Rapid Commun. 14: 55-58, 1993). También han existido enfoques para usar glicosidasas, que catalizan la hidrólisis de glicósido *in vivo*, para la síntesis de glicósido mediante hidrólisis inversa (véase, por ejemplo I. Gill y R. Valivety, Angew. Chem. Int. Ed. 39 (21): 3.804-3.808, 2000).
25

La solicitud de patente europea EP 0 226 563 A1 describe un procedimiento de preparación de dos glicósidos de galactosa etilénicamente insaturados haciendo reaccionar lactosa y metacrilato de hidroxietilo en presencia de β -galactosidasa-agarosa en una mezcla de disolventes de un tampón acuoso de fosfato sódico y DMF.

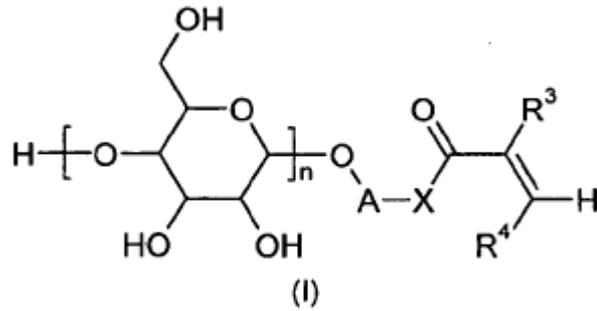
30 En el desarrollo de procedimientos para síntesis de glicósidos catalizada por glicosidasa, se han encontrado dificultades en la búsqueda de condiciones de solventes óptimas. Por un lado, para favorecer la hidrólisis inversa controlada termodinámicamente debe minimizarse el contenido de agua, o más bien la actividad a_w termodinámica del agua. Por otro lado, los sacáridos, que generalmente son fácilmente solubles en agua, frecuentemente son escasamente solubles en medios orgánicos. Se ha propuesto reemplazar el agua por disolventes anhidros de polaridad media como una manera de cumplir con ambas necesidades. Sin embargo, se demostró que las glicosidasas comúnmente empleadas aparentemente necesitaban al menos un poco de agua para permanecer activas. (F. van Rantwijk et al., J. Mol. Catalysis B: Enzymatic 6:511-532, 1999). Estos requisitos divergentes relativos a los disolventes son difíciles de satisfacer. Esto se refleja en las elevadas temperaturas y los largos tiempos de reacción que requieren, en general, los procedimientos conocidos para la síntesis enzimática de glicósidos.
35

40 Por lo tanto, un objeto de la presente invención fue desarrollar un procedimiento eficaz para la producción enzimática de glicósidos etilénicamente insaturados. Esto puede conseguirse aumentando la velocidad de reacción y/o desplazando el equilibrio de la reacción en favor de la síntesis de glicósidos. De esta manera, se obtiene una mayor cantidad de producto después de un tiempo de reacción determinado y/o cuando se alcanza el equilibrio.

45 Ahora, los inventores han encontrado inesperadamente que la adición de 1,4-dioxano a una mezcla de reacción que comprende sacárido, alcohol etilénicamente insaturado, glicosidasa y agua, puede aumentar significativamente la cantidad de glicósido etilénicamente insaturado obtenida después de un cierto tiempo de reacción.

De esta manera, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de un glicósido etilénicamente insaturado de Fórmula I

5



en la que

10

n es 1, 2 o 3;

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

X es seleccionado de entre el grupo que consiste en -O-, -NH- y -NR⁵-;

R³ es seleccionado del grupo que consiste en -H, y alquilo C₁₋₁₀;

R⁴ es seleccionado de entre el grupo que consiste en -H, -COOH y -COO- M⁺;

15

R⁵ es alquilo C₁₋₁₀;

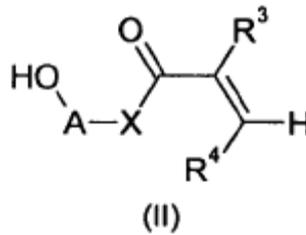
R⁶ es H o -CH₃;

M⁺ es seleccionado de entre el grupo que consiste en Li⁺, Na⁺, K⁺ y NH₄⁺; y

x es un número entero de 0 a 200;

que comprende hacer reaccionar un alcohol etilénicamente insaturado de Fórmula II

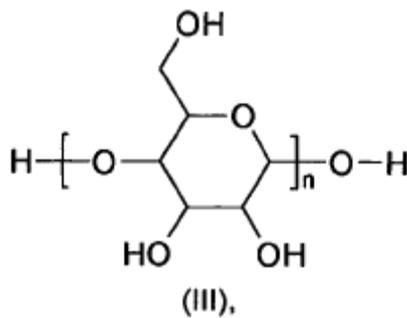
20



25

con un sacárido de Fórmula III

30



en presencia de una glicosidasa

35

(i) en una relación molar inicial de alcohol etilénicamente insaturado de Fórmula II a sacárido de Fórmula III de 2:1 a 30:1, por ejemplo de 15:1 a 25:1;

(ii) en presencia de una mezcla disolvente de agua y 1,4-dioxano en una relación de peso de agua a 1,4-dioxano de 0,1:1 a 9:1, por ejemplo de 1:1 a 3:1; y

(iii) en una relación en peso inicial de la mezcla de disolvente a sacárido de 3:1 a 30:1, por ejemplo de 10:1 a 20:1.

Definiciones

5 El término "monosacárido", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una única 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 dos unidades de monosacárido, así como trisacáridos que incluyen tres unidades de monosacárido. Un "polisacárido" consiste en largas cadenas de unidades de monosacárido unidas covalentemente.

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

15 Un procedimiento "catalizado enzimáticamente" o "biocatalítico", tal como se usa en la presente en la presente memoria, significa que dicho procedimiento es realizado bajo la acción catalítica de una enzima, en particular, una glicosidasa. El procedimiento puede ser realizado en presencia de dicha glicosidasa en forma aislada (purificada, enriquecida) o cruda.

El término "glicosidasa" incluye también variantes, mutantes y porciones enzimáticamente activas de glicosidasas.

20 Las cantidades catalíticas de la enzima se expresan en "U" ("Unidad" o "unidad"), en la que 1 U es igual a la cantidad de enzima que cataliza la reacción de 1 μ mol de sustrato por minuto bajo condiciones específicas (normalmente, 37°C y pH 7,5). De esta manera, 10 U de glicosidasa es igual a una cantidad catalítica de enzima requerida para la reacción de 10 μ mol de sustrato sacárido por minuto. Las cantidades catalíticas de amilasa maltogénica pueden ser expresadas en "MANU" (Maltogenic Amylase Novo Unit, Novo Unidad de Amilasa Maltogénica), en la que 1 MANU es igual a la cantidad catalítica de enzima requerida para la reacción de 1 μ mol de maltotriosa por minuto bajo condiciones estándar (10 mg/ml de maltotriosa, 37°C, pH 5,0, tiempo de reacción de 30 min). La cantidad catalítica de una enzima puede ser determinada mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

30 El término "alquilo" comprende radicales alquilo C_{1-10} que son radicales lineales o ramificados que tienen de 1 a 10 átomos de carbono. Los ejemplos de los mismos son metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, 2-butilo, isobutilo o tert-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-dimetilbutil, 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 constitucionales, tales como 2-etilhexilo.

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

La expresión "etilénicamente insaturado" se refiere a un compuesto que comprende un doble enlace C=C no aromático. Específicamente, un "glicósido etilénicamente insaturado", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un glicósido que consiste en un sacárido que está unido glicosídicamente a un alcohol etilénicamente insaturado.

40 Se entiende que un "disolvente orgánico miscible en agua" significa un disolvente orgánico que forma una mezcla homogénea con agua en la relación en peso de agua a disolvente orgánico usado. El disolvente orgánico no es un alcohol primario o secundario y, por consiguiente, es no reactivo con respecto al sacárido. El disolvente orgánico usado en la presente invención es 1,4-dioxano.

El alcohol etilénicamente insaturado de Fórmula II es seleccionado de entre

45 (Met) acrilatos de hidroxialquilo;

N-hidroxialquil (met) acrilamidas; o

Mono (hidroxialquil) ésteres de ácido maleico o sus sales.

En otras realizaciones, el alcohol etilénicamente insaturado de Fórmula II es un derivado etoxilado, propoxilado o etoxilado y propoxilado de los alcoholes etilénicamente insaturados indicados anteriormente.

Los alcoholes etilénicamente insaturados preferidos de Fórmula II son seleccionados de entre acrilato de 2-hidroxietilo, metacrilato de 2-hidroxietilo, acrilato de 3-hidroxipropilo, metacrilato de 3-hidroxipropilo, N-(2-hidroxietil)acrilamida, N-(2-hidroxietil)metacrilamida, N-(3-hidroxipropil)acrilamida, N-(3-hidroxipropil)metacrilamida, maleato de (2-hidroxietil)hidrógeno.

5 En ciertas realizaciones n es 1; A es alquileo $C_{2,6}$; X es -O-; y R^3 es -H o -CH₃.

10 El sacárido puede ser un monosacárido, tal como glucosa, galactosa o manosa; un disacárido, tal como maltosa, lactosa o celobiosa; un trisacárido, tal como maltotriosa; o una mezcla de los mismos. El procedimiento de la presente invención no requiere que el sacárido sea activado, por ejemplo, por la presencia de un grupo alquilo o o-nitrofenilo unido a través de un enlace éter al átomo de carbono en la posición 1 (C-1) del sacárido. De manera adecuada, el sacárido es seleccionado de entre el grupo que consiste en D-glucosa, D-galactosa, D-manosa y sus mezclas.

15 En el procedimiento de la presente invención, la reacción de un sacárido y un alcohol etilénicamente insaturado es catalizada por una glicosidasa, un tipo de enzima conocido también como glicósido hidrolasa. Típicamente, las enzimas muestran una alta especificidad con respecto a las reacciones que catalizan, los sustratos que están implicados en estas reacciones. Las glicosidasas son enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de compuestos O- y S-glicosídicos. Además, las glicosidasas pueden ser usadas para catalizar la formación de enlaces glicosídicos mediante hidrólisis inversa, donde la posición de equilibrio de la reacción se invierte, o mediante transglicosilación, donde una fracción glicósida es transferida desde un glicósido, es decir, el glicósido donante, a otro glicósido, es decir, el glicósido aceptor, para formar un nuevo glicósido. Las glicosidasas reciben un número de clasificación enzimática EC 3.2.1.x.

20 La glicosidasa puede ser usada en una forma purificada, como un concentrado enriquecido o como una preparación enzimática bruta.

De manera adecuada, la glicosidasa presente en el procedimiento de la invención es seleccionada de entre el grupo que consiste en amilasas, celulasas, glicosidasas y galactosidasas.

25 La α -amilasa es una enzima que tiene un número de clasificación enzimática EC 3.2.1.1, y es conocida también como glicogenasa, endoamilasa, Taka-amilasa A, o 1,4- α -D-glucan glucohidrolasa. Las α -amilasas son capaces de catalizar la endohidrólisis de enlaces (1 \rightarrow 4)- α -D-glicosídicos en polisacáridos que contienen tres o más unidades D-glucosa con enlace (1 \rightarrow 4)- α , tales como almidón y glicógeno, liberando de esta manera grupos reductores en la configuración α .

30 La β -amilasa es una enzima que tiene un número de clasificación enzimática EC 3.2.1.2, y es conocida también como sacarogen amilasa, glicogenasa o 1, 4- α -D-glucan matohidrolasa. Las β -amilasas son capaces de catalizar la hidrólisis de enlaces (1 \rightarrow 4)- α -D-glicosídicos en polisacáridos, tales como almidón y glicógeno, liberando de esta manera unidades β -maltosa sucesivas desde los extremos no reductores de las cadenas de polisacáridos.

35 La celulasa es una enzima que tiene un número de clasificación enzimática EC 3.2.1.4, y es conocida también como endo-1,4- β -D-glucanasa, β -1,4-glucanasa, β -1,4-endoglucan hidrolasa, celulasa A, celulosina AP, endoglucanasa D, celulasa alcalina, celulasa A 3, celudextrinasa, 9,5 celulasa, avicelasa, pancelasa SS o 1,4-(1,3;1,4)- β -D-glucan 4-glucohidrolasa. Las celulasas son capaces de catalizar la endohidrólisis de enlaces (1 \rightarrow 4)- β -D-glicosídicos en celulosa, liquenina y β -D-glucanos de cereales, así como enlaces 1,4- en β -D-glucanos que contienen también enlaces 1,3-.

40 La α -glicosidasa es una enzima que tiene un número de clasificación enzimática EC 3.2.1.20, y es conocida también como maltasa, glucoinvertasa, glicosidosacarasa, maltasa-glucoamilasa, α -glucopiranosidasa, glicosidoinvertasa, α -D-glicosidasa, α -glucósido hidrolasa o α -1,4-glicosidasa. Las α -glicosidasas son capaces de catalizar la hidrólisis de residuos α -D-glucosa terminales, no reductores, con enlace (1 \rightarrow 4), liberando de esta manera α -D-glucosa.

45 La β -glicosidasa es una enzima que tiene un número de clasificación enzimática EC 3.2.1.21, y es conocida también como gentiobiasa, celobiasa, emulsina, elaterasa, aril- β -glicosidasa, β -D-glicosidasa, β -glucósido glucohidrolasa, arbutinasa, amigdalinas, p-nitrofenil β -glicosidasa, primeverosidasa, amigdalasa, limarasa, salicilinas o β -1,6-glicosidasa. Las β -glicosidasas son capaces de catalizar la hidrólisis los residuos β -D-glucosilo no reductores, terminales, liberando de esta manera β -D-glucosa.

La α -galactosidasa es una enzima que tiene un número de clasificación enzimática EC 3.2.1.22, y es conocida también como melibiasa, α -D-galactosidasa, α -galactosidasa A o α -galactósido galactohidrolasa. Las α -galactosidasas son capaces de catalizar la hidrólisis de los residuos α -D-galactosa no reductores, terminales, en α -D-galactósidos, incluyendo oligosacáridos de galactosa, y galactomananos.

50 La β -galactosidasa es una enzima que tiene un número de clasificación enzimática EC 3.2.1.23, y es conocida también como lactasa, β -lactosidasa, maxilact, hydrolact, β -D-lactosidasa, S 2107, lactozym, trilactasa, β -D-galactanasa, orizatim, o sumiklat. Las β -galactosidasas son capaces de catalizar la hidrólisis de los residuos de β -D-galactosa no reductores,

terminales, en β -D-galactósidos.

Una forma cruda de glicosidasa que es adecuada para el procedimiento de la presente invención es harina de semilla de fruta. Las harinas de semillas de frutas son catalizadores robustos y reciclables que pueden ser producidos de una manera fácil y rentable. La preparación y la actividad enzimática específica de las harinas de semilla de fruta han sido descritas por Lu et al. (Practical methods for Biocatalysts, Whittall y Satton (eds.), Wiley, 2010, capítulo 7.3, páginas 236-239). Las harinas de semillas de frutas que pueden ser usadas en el procedimiento de la presente invención comprenden harina de semilla de *Prunus dulcis* (almendra), harina de semilla de *Prunus persica* (melocotón), harina de semilla de *Prunus armeniaca* (albaricoque), harina de semilla de *Malus pumila* (manzana) y harina de semilla de *Eriobotrya japonica* (níspero). Preferiblemente, la harina de semilla de fruta usada es seleccionada de entre el grupo que consiste en harina de semilla de *Prunus dulcis*, harina de semilla de *Prunus persica* y harina de semilla de *Malus pumila*.

La enzima puede ser disuelta en la mezcla de reacción o inmovilizada sobre un soporte sólido que es puesto en contacto con la mezcla de reacción. Si la enzima es inmovilizada, es fijada a un portador inerte. Los materiales portadores adecuados son conocidos en la técnica. Los ejemplos de materiales portadores adecuados son arcillas, minerales de arcilla tales como caolinita, tierra diatomacea, perlita, sílice, alúmina, carbonato sódico, carbonato cálcico, 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 un portador, generalmente se usan materiales portadores en forma de polvos finos, en los que se prefieren las formas porosas. El tamaño de partícula del material portador normalmente no supera los 5 mm, en particular 2 mm. Además, los materiales portadores adecuados son alginato de calcio y carragenina. Las enzimas pueden ser vinculadas directamente mediante glutaraldehído. Se conocen una amplia gama de procedimientos de inmovilización en la técnica (por ejemplo, J. Lalonde y A. Margolin "Immobilization of Enzymes" en K. Drauz und H. Waldmann, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis 2002, vol. III, 991-1032, Wiley-VCH, Weinheim).

La reacción catalizada enzimáticamente puede llevarse a cabo de manera discontinua, semi-continua o continua. Los reactivos pueden ser suministrados al inicio de la reacción o pueden ser suministrados posteriormente, de manera continua o semi-continua. La cantidad catalítica de glicosidasa requerida 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 es realizada en una mezcla disolvente de agua y 1,4-dioxano, tal como se ha descrito anteriormente. La mezcla de reacción puede comprender además, aunque no obligatoriamente, un tampón adecuado con el fin de ajustar el pH a un valor de 6,0 a 9,0, por ejemplo en el intervalo de 6,5 a 8,0, tal como en el intervalo de 7,0 a 7,8. Los tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, acetato de sodio, tris(hidroximetil)aminometano ("TRIS") y tampones fosfato.

La concentración de los reactivos, es decir, sacárido y alcohol etilénicamente insaturado, puede ser adaptada a las condiciones de reacción óptimas. Por ejemplo, la concentración inicial de sacárido puede estar comprendida en el intervalo de 100 mM a 3.000 mM, por ejemplo de 200 mM a 500 mM. Un reactivo, es decir, el alcohol etilénicamente insaturado, es usado en exceso molar con el fin de desplazar el equilibrio de la reacción hacia el lado del producto.

La temperatura de reacción puede ser adaptada a las condiciones de reacción óptimas, que pueden depender de la enzima específica aplicada. La reacción puede tener lugar de manera conveniente a temperaturas comprendidas 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 puede realizarse a una temperatura comprendida en el intervalo de 0°C a 80°C, por ejemplo de 40°C a 60°C o a aproximadamente 50°C.

El procedimiento puede continuar hasta que se alcanza el equilibrio entre los reactivos y los productos, pero puede ser detenido antes. Los tiempos de proceso normales están comprendidos en el intervalo de 6 h a 96 h, por ejemplo de aproximadamente 24 h.

La metodología de la presente invención puede comprender además una etapa de recuperación del glicósido etilénicamente insaturado producido. El término "recuperación" incluye extracción, recogida, aislamiento o purificación del compuesto a partir de la mezcla de reacción. La recuperación del compuesto puede ser realizada según cualquier metodología convencional de aislamiento o purificación conocida en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, un tratamiento con una resina convencional (por ejemplo, resina de intercambio aniónico o catiónico, resina de adsorción no iónica, etc.), un tratamiento con un adsorbente convencional (por ejemplo, carbón activado, ácido silícico, gel de sílice, celulosa, alúmina, etc.), alteración del pH, extracción de disolvente (por ejemplo, con un disolvente convencional, tal como un alcohol, acetato de etilo, hexano y similares), destilación, diálisis, filtración, concentración, cristalización, recristalización, ajuste de pH, liofilización y similares.

La identidad y la pureza del producto aislado pueden ser determinadas mediante técnicas conocidas, tales como cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases (GC), espectroscopia (por ejemplo, IR, UV, espectroscopía de RMN), procedimientos de coloración, NIRS, o ensayos

enzimáticos.

Ejemplo 1: Síntesis de acrilato de 2-(β-glucosiloxi)-etilo catalizada por β-glucosidasa a partir de D-glucosa

Se disolvió 1,0 g de D(+)-glucosa en 2 ml de agua. Se añadieron 12 ml de acrilato de 2-hidroxietilo (que contenía 200 ppm de MEHQ) y 1 ml de 1,4-dioxano a la solución de glucosa. La reacción se inició mediante la adición de 0,070 g (364 U) de β-glucosidasa de Almonds. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h a 50°C. El producto se detectó mediante cromatografía en capa fina (TLC) (cloroformo/metanol 4/1 (v/v), Rf 0,55) y se purificó mediante 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 eliminó mediante evaporación rotatoria. Rendimiento: 0,459 g (46%). Pureza: 99%

¹H-RMN δ en ppm: 3,2-4,2 GlucOCH₂CH₂R (8p); 4,39 GlucOCH₂CH₂R (2p Tri J 4,38 4,38 Hz); 4,50 GlucH_α (1p Dou J 7,91 Hz); 5,99 H_{trans}CH=CHR (1p Dou J 10,46 Hz); 6,22 CH₂=CHR (1 p DDou J 17,29 10,46 Hz); 6,46 H_{cis}CH=CHR (1 p Dou J 17,30 Hz)

¹³C-RMN 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: 301,0894 (C₁₁H₁₈O₈Na); observado: 301,2500

Ejemplo 2: Síntesis de metacrilato de 2-(β-glucosiloxi)-etilo catalizada por β-glucosidasa a partir de D-glucosa

Se disolvió 1,0 g de D(+)-glucosa en 2 ml de agua. Se añadieron 12 ml de metacrilato de 2-hidroxietilo (que contenía 200 ppm de MEHQ) y 1 ml de 1,4-dioxano a la solución de glucosa. La reacción se inició mediante la adición de 0,070 g (364 U) de β-glucosidasa de Almonds. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h a 50°C. El producto se detectó mediante TLC (cloroformo/metanol 4/1 (v/v), Rf 0,59) y se purificó mediante 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 eliminó mediante evaporación rotatoria.

Rendimiento: 0,514 g (51%). Pureza: 97%

¹H-RMN δ en ppm: 1,91 CH₂=C(CH₃)R (3p Sin); 3,2-4,2 GlucOCH₂H₂R (8p); 4,35 GlucOCH₂CH₂R (2p Tri J 4,37 4,37 Hz); 4,48 GlucH_α (1p Dou J 7,92 Hz); 5,70 H_{trans}CH=CCH₃R (1p Sin); 6,14 H_{cis}CH=CHCH₃R (1p Sin)

¹³C-NMR δ en ppm: 17,5 H₂C=C(CH₃)R; 60,8 GlucC₆; 64,5 OCH₂CH₂; 68,1 OCH₂CH₂; 69,7 GlucC₅; 73,2 GlucC₂; 75,8 GlucC₃; 76,1 GlucC₄; 102,7 GlucC_{1β}; 127,1 H₂C=C(CH₃)R; 135,9 H₂C=C(CH₃)R; 169,8 O(O)CR

Ejemplo 3: Síntesis de acrilato de 4-(β-glucosiloxi)-butilo catalizada por β-glucosidasa a partir de D-glucosa

Se disolvió 1,0 g de D(+)-glucosa en 2 ml de agua. Se añadieron 12 ml de acrilato de 4-hidroxibutilo (que contenía 200 ppm de MEHQ) y 1 ml de 1,4-dioxano a la solución de glucosa. La reacción se inició mediante la adición de 0,070 g (364 U) de β-glucosidasa de Almonds. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h a 50°C. El producto se detectó mediante TLC (cloroformo/metanol 4/1 (v/v), Rf 0,69) y se purificó mediante 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 eliminó mediante evaporación rotatoria. Rendimiento: 0,310 g (31%). Pureza (> 85%)

¹H-RMN δ en ppm: 1,75 OCH₂CH₂CH₂CH₂O (4p); 3,2-4,2 GlucOCH₂CH₂R (8p); 4,21 (O)COCH₂R (2p Tri J 5,90 5,90 Hz); 4,43 GlucH_α (1p Dou J 7,96 Hz); 5,95 H_{trans}CH=CHR (1p Dou J 10,43 Hz); 6,22 CH₂=CHR (1p DDou J 17,36 10,35 Hz); 6,41 H_{cis}CH=CHR (1p Dou J 17,32 Hz)

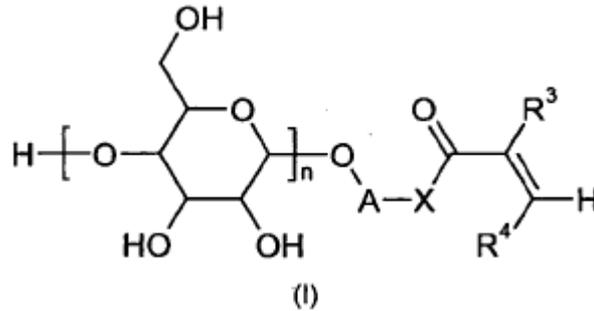
¹³C-RMN δ en ppm: 24,7 OCH₂CH₂CH₂CH₂O; 25,6 OCH₂CH₂CH₂CH₂O; 61,0 GlucC₆; 61,7 OCH₂R; 65,4 (O) COCH₂R; 69,9 GlucC₅; 73,3 GlucC₂; 76,0 GlucC₃; 76,1 GlucC₄; 102,4 GlucC_{1β}; 127,9 H₂C=CHR; 132,4 H₂C=CHR; 168,9 RO(O)CR

ESI-MS pos: calculado: 329,1207 (C₁₃H₂₂O₈Na); observado: 329,1188.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un glicósido etilénicamente insaturado de Fórmula I

5



10 en la que

n es 1, 2 o 3;

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

X es seleccionado de entre el grupo que consiste en -O-, -NH- y -NR⁵-;

R³ es seleccionado de entre el grupo que consiste en -H y alquilo C₁₋₁₀;

15

R⁴ es seleccionado de entre el grupo que consiste en -H, -COOH y -COO⁻ M⁺;

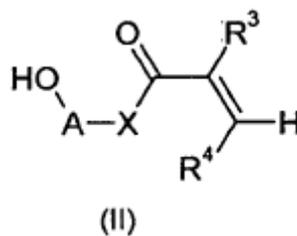
R⁵ es alquilo C₁₋₁₀;

R⁶ es -C₂H₄- o -C₃H₆-;

M⁺ es seleccionado de entre el grupo que consiste en Li⁺, Na⁺, K⁺ y NH₄⁺; y x es un número entero de 0 a 200;

que comprende hacer reaccionar un alcohol etilénicamente insaturado de Fórmula II

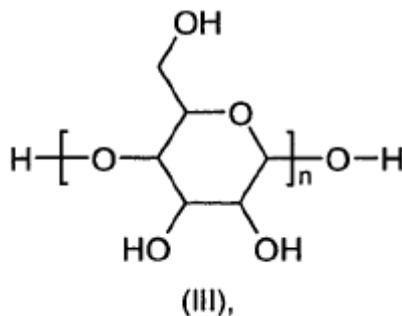
20



25

con un sacárido de Fórmula III

30



en presencia de una glicosidasa

35

(i) en una relación molar de alcohol etilénicamente insaturado de Fórmula II a sacárido de Fórmula III de 2:1 a 30:1;

(ii) en presencia de una mezcla disolvente de agua y 1,4-dioxano en una relación en peso de agua a 1,4-dioxano de 0,1:1 a 9:1; y

(iii) en una relación en peso de mezcla disolvente a sacárido de 3:1 a 30:1.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que

5 A es alquileo C_{2-6} ;

 X es -O-; y

R^3 es -H o -CH₃.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el sacárido es seleccionado de entre el grupo que consiste en D-glucosa, D-galactosa, D-manosa y sus mezclas.

10 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la glicosidasa es seleccionada de entre el grupo que consiste en amilasas, celulasas, glucosidasas y galactosidasas.