

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 398**

21 Número de solicitud: 201930082

51 Int. Cl.:

C12P 19/44 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

04.02.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

04.08.2020

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

C/ Serrano nº 117

28006 Madrid ES

72 Inventor/es:

NIETO DOMÍNGUEZ, Manuel José;
MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, María Jesús;
CAÑADA VICINAY, Francisco Javier;
GONZÁLEZ SANTANA, Andrés;
PRIETO AORZAMCO, Alicia y
ASENSIO, Juan Luis

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

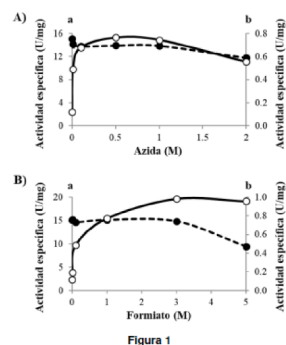
Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE GLICOCONJUGADOS**

57 Resumen:

La presente invención es un procedimiento de obtención de un glicoconjugado, que comprende poner en presencia de una tioglicoligasa de la familia GH3 una molécula de carbohidrato unida a un buen grupo saliente como donador, y una molécula orgánica con un grupo funcional en su forma neutra como aceptor, a un valor de pH próximo al valor de pK_a del mencionado grupo funcional, con la condición de que dicho aceptor no presente en su estructura una carga positiva o negativa capaz de interaccionar con dicho centro activo. La tioglicoligasa obtenida aumenta sorprendentemente la gama de aceptores válidos para formar glicoconjugados.



PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE GLICOCONJUGADOS

SECTOR TÉCNICO

- 5 La presente invención se engloba dentro de la biocatálisis, en el campo de la síntesis de glicoconjugados utilizando herramientas enzimáticas modificadas.

ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 Los glicoconjugados se definen como compuestos formados por una molécula de carbohidrato unido a otra no glucídica a través de un enlace covalente.

- Bajo esta denominación se encuentra una amplísima variedad de biomoléculas que juegan un papel metabólico esencial, y también distintos compuestos obtenidos artificialmente. Los ésteres de azúcares y ácidos grasos, polifenoles glicosilados, 15 glicopéptidos y glicoproteínas, monosacáridos activados por unión a nucleótido, azúcares fosfato, tioglicósidos o selenoglicósidos entrarían en esta clasificación.

- A pesar de que se han desarrollado diferentes metodologías para abordar la síntesis de glicoconjugados ninguna de ellas se encuentra exenta de importantes limitaciones.

- 20 Las aproximaciones basadas en síntesis química convencional presentan una selectividad muy baja. Esto es especialmente importante debido a la similitud química entre los distintos hidroxilos de un carbohidrato, que obliga a proteger aquellos que no se desea que participen en la formación del enlace para evitar una mezcla de productos cuya purificación sería complicada y costosa. Se necesitan varios pasos de protección 25 y desprotección que disminuyen el rendimiento final de la producción. Los métodos químicos también requieren del uso de reactivos altamente tóxicos y pueden dar lugar a productos secundarios igualmente nocivos.

- 30 Estos inconvenientes se pueden constatar en las aproximaciones químicas para formar glicoconjugados a través de enlaces *O*-glicosídico, éster y fosfoéster, como se describe a continuación.

- 35 La reacción de Koenings-Knorr, junto con sus variantes modificadas suele implicar el uso de sales de metales pesados, la protección del carbohidrato y también la del

compuesto no glucídico, o una purificación compleja cuando éste posee varios hidroxilos y no está protegido. Así, los rendimientos para la síntesis de ciertos glicósidos de polifenoles de cierta complejidad pueden reducirse hasta valores en torno al 10% de conversión molar. La situación es similar respecto a la obtención de ésteres y fosfoésteres de carbohidratos, o de la producción de azúcares-1-fosfato, sustratos clave para la síntesis de carbohidratos activados. Del mismo modo, aunque existen metodologías químicas para la esterificación de carbohidratos y ácidos carboxílicos se considera que son energéticamente más costosas que sus alternativas enzimáticas, a lo que, como en los casos anteriores, se suma la baja selectividad y la formación de productos secundarios tóxicos.

Las estrategias enzimáticas se caracterizan por su alta selectividad y por permitir síntesis en condiciones ambientalmente más respetuosas.

En función de la naturaleza del aceptor al que se quiere unir la molécula de carbohidrato es necesario seleccionar un tipo de enzima determinado; de esta forma, algunos de los biocatalizadores más utilizados son las lipasas para la formación de ésteres de ácidos grasos y azúcares; quinasas y glicano fosforilasas para obtener glicósidos fosforilados; o glicosidasas (GHs) y glicosiltransferasas para glicosilar proteínas y polifenoles. Sin embargo, aparte del coste del biocatalizador cada una de estas clases enzimáticas posee su propia problemática. A modo de ejemplo, cabe mencionar el alto contenido en solventes orgánicos en el que operan las lipasas, lo que reduce mucho la solubilidad de los carbohidratos; el alto coste de los sustratos de las quinasas y glicosil transferasas; que la síntesis catalizada por glicosidasas está asociado a bajos rendimientos y son pocas las capaces de transferir carbohidratos a polifenoles de interés, aparte de que estas enzimas pueden degradar el glicósido que forman.

A pesar de sus inconvenientes, la síntesis de glicoconjugados utilizando glicosidasas ha despertado un gran interés debido a la robustez de estos biocatalizadores y a que pueden utilizar sustratos de muy bajo coste, como son muchos polisacáridos. Las glicosidasas son uno de los grupos de enzimas más abundante y diverso de la naturaleza, cuyo potencial apenas ha comenzado a explorarse. Engloba a más de 150 familias distintas y comprende unas 200 actividades diferentes en base a los sustratos sobre los que pueden actuar.

35

En este sentido, se han desarrollado mutantes de glicosidasas con el fin de suprimir la hidrólisis del producto deseado e incrementar así el rendimiento de la producción.

5 Todas las glicosidasas presentan dos residuos ácidos en el centro activo necesarios para la actividad de la enzima, uno denominado catalítico ácido/base (en adelante, residuo catalítico) y otro denominado catalítico nucleófilo (en adelante, residuo nucleófilo). La idea básica que subyace consiste en la sustitución de alguno de los dos
10 residuos ácidos esenciales por uno no ácido para así suprimir la capacidad hidrolítica de la enzima; bien el que lleva a cabo el ataque nucleófilo sobre el sustrato o bien el que lleva a cabo la catálisis ácido/base general. Si se muta el residuo catalítico ácido/base se obtiene una **tioglicoligasa**. Si se muta el residuo nucleófilo se obtiene una **glicosintasa**. El mecanismo de cada una de ellas es distinto.

15 Las glicosintasas transfieren carbohidratos a partir de fluoroazúcares y mantienen el perfil de posibles aceptores propio de su forma silvestre. Aumentan el rendimiento en comparación a la forma silvestre y pierden por completo la capacidad de hidrolizar el producto formado.

20 La solicitud US5716812 y describe una glicosintasa en que el aminoácido nucleófilo silvestre del sitio activo se ha cambiado por otro aminoácido no-nucleófilo. La enzima mutante consigue sintetizar oligosacáridos preparando una mezcla de fluoruro de α -glicosilo y un aceptor de glucósido. Un aspecto preferible de la invención incluye una forma mutante de β -glucosidasa de *Agrobacterium* en la que el aminoácido silvestre de glutámico de la posición 358 se reemplaza por un residuo de alanina.

25 Las tioglicoligasas incorporan sin embargo la necesidad de un donador con un buen grupo saliente además que el aceptor sea un buen nucleófilo, normalmente un tiol o aniones de muy pequeño tamaño. Esta necesidad de utilizar nucleófilos fuertes es el principal inconveniente de estos mutantes porque implica un rango muy restringido de
30 aceptores. Cambia el perfil de potenciales aceptores respecto a la enzima silvestre y que en lugar de *O*-glicósidos los productos obtenidos son frecuentemente *S*-glicósidos; por otro lado, consiguen también altos rendimientos y el producto no es susceptible a la hidrólisis. Otro tipo de compuestos aceptores de interés, como antioxidantes polifenólicos o ácidos cinámicos en su forma neutra no son lo suficientemente

nucleófilos para atacar el intermediario enzima-sustrato, mientras que en su forma aniónica no funcionan.

5 Hasta ahora la única excepción a esta limitación del aceptor lo conformaban las tioglicoligasas obtenidas de glicosidasas de retención de la configuración de tipo alfa, porque el intermediario enzima-sustrato que forman es susceptible de ser atacado por nucleófilos pobres como los alcoholes. Sin embargo, muestran fuertes inhibiciones cuando se incrementa la concentración del aceptor, y por otra parte el rango de aceptores válidos está limitado a aquellos capaces de establecer interacciones de
10 estabilización con otros residuos del centro activo (Kim et al., 2010, "O-Glycoligases, a new category of glycoside bond-forming mutant glycosidases, catalyse facile syntheses of isoprimeverosides". Chem Commun 46:8725-8727). Este tipo de tioglicoligasas requieren además donadores carbohidrato con flúor en la posición alfa, que son más inestables que los carbohidratos unidos a un grupo nitrofenol, por ejemplo.

15

El resumen de la solicitud KR 20140148029 hace referencia a una tioglicoligasa de tipo alfa, por lo que previsiblemente presenta los inconvenientes descritos. De hecho, una de las dos enzimas descritas en la solicitud es precisamente Yicl, la misma que se investiga en la referencia de Kim et al.

20

Dentro de las glicosidasas cabe destacar la familia GH3 por su potencial biotecnológico. Este interés viene dado porque agrupa enzimas activas frente a celulosa y xilano, las dos principales fuentes de carbono de la biosfera, además del gran tamaño de la familia con más de 22.000 miembros depositados hasta la fecha. Fue una de las primeras
25 familias de glicosidasas identificadas en la clasificación en base a identidad de secuencia aminoacídica propuesta por Henrissat (Henrissat B. 1991, "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." Biochem J 280:309). Una relación actual de las enzimas de la familia está disponible en la base de datos CAZy de enzimas activas sobre carbohidratos (www.cazy.org).

30

Las glicosidasas de la familia GH3 presentan un tercer residuo ácido conservado en el centro activo, además de los otros dos descritos antes y necesarios para su actividad. Se ha especulado con la utilidad de este tercer residuo ácido en la enzima silvestre, en el sentido siguiente.

35

Hrmova ha propuesto un papel de acomodación del carbohidrato en el centro activo, ya que interacciona con los hidroxilos de las posiciones C4 o C6 (Hrmova, M. y col. "Three-dimensional structure of the barley b-D-glucan glucohydrolase in complex with a transition state mimic", 2004, J. Biol. Chem. 279, 4970-4980).

5

Pozzo muta varios residuos conservados de GH3, incluyendo ese tercer residuo ácido, y observa una pérdida de actividad que le lleva a pensar que podría tener algún papel en la catálisis (Pozzo, T. y col. "Structural and functional analyses of b-glucosidase 3B from *Thermotoga neapolitana*: A thermostable three-domain representative of glycoside hydrolase 3", 2010, J Mol Biol 397, 724-739).

10

Entre las glicosidasas descritas en la técnica de la familia GH3 se incluyen BxTW1 y BGL-2, ambas producidas de forma natural por el hongo filamentoso *Talaromyces amestolkiae* (Méndez-Líter et al. "A novel, highly efficient b-glucosidase with a cellulose-binding domain: characterization and properties of native and recombinant proteins", 2017, Biotechnol. Biofuels 10, 256; Nieto-Domínguez et al., "Enzymatic fine-tuning for 2-(6-hydroxynaphthyl) b-D-xylopyranoside synthesis catalyzed by the recombinant b-xylosidase BxTW1 from *Talaromyces amestolkiae*", 2016, Microb. Cell Fact. 15, 1-15). Estas enzimas son activas y estables a un perfil anormalmente bajo de pH, en valores entre 2 y 5,5.

15

20

En resumen, las versiones mutadas de glicosidasas descritas por la técnica han superado algunas de las limitaciones asociadas a la glicosilación con enzimas, pero la naturaleza de los posibles aceptores sigue siendo muy restringida. Es necesario el desarrollo de nuevas herramientas para la síntesis de glicoconjugados.

25

El problema de la técnica actual es encontrar una glicosidasa mutada capaz de aumentar la gama de glicoconjugados. La presente invención ha encontrado la solución de las glicosidasas GH3 mutadas en el residuo ácido catalítico del centro activo por un residuo no ácido.

30

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han encontrado que sorprendentemente las tioglicoligasas resultantes de la mutación de β -glicosidasas GH3 no está restringidas a operar con nucleófilos fuertes como aceptores en una reacción de transglicosilación, lo que permite aumentar mucho la gama de aceptores susceptibles de recibir el carbohidrato.

35

La razón podría ser que el tercer residuo ácido del centro activo es capaz de captar un protón del aceptor. De este modo, el grupo funcional de un aceptor que entrase neutro en el centro activo, al perder ese protón se convierte en un anión y en ese estado incluso compuestos que en principio tienen baja nucleofilicidad la incrementarían.

5

Por el contrario, si los grupos funcionales o glicosilables de los aceptores se utilizasen en estas tioglicoligasas inicialmente en su forma aniónica en lugar de la neutra no reaccionarían con el intermediario enzima-sustrato y el glicoconjugado no se formaría, probablemente debido a algún tipo de repulsión electrostática que impide la aproximación del aceptor con carga. Una excepción a este comportamiento la supondrían aquellos compuestos de pequeño tamaño, igual o inferior a 70 Da, como sería el caso de la azida.

10

Esto sería aplicable también a las α -glicosidasas GH3.

15

Se identifican así en la presente solicitud compuestos con grupos funcionales en su forma neutra que actúan como aceptores, mientras que no lo hacen en su forma aniónica. Esto está en abierta contradicción con lo que se había descrito hasta ahora para mutantes de glicosidasas en el residuo catalítico, ya que la forma aniónica de un grupo funcional es más nucleófila que la neutra.

20

En la presente invención se denomina "donador" al compuesto formado por un carbohidrato unido a un grupo saliente en su posición anomérica que reacciona con el residuo nucleófilo de la enzima formando un nuevo enlace glicosídico y liberando el grupo saliente. El nuevo enlace se forma entre carbono anomérico del carbohidrato del donador y el residuo nucleófilo de la glicosidasa formando el intermediario enzima-sustrato.

25

En la presente invención se denomina "aceptor" a un compuesto con al menos un grupo nucleófilo capaz de reaccionar con el intermediario enzima-sustrato de manera que se rompa el enlace que los mantiene unidos y se forme un nuevo enlace glicosídico entre el carbono anomérico del carbohidrato y el grupo nucleófilo del aceptor.

30

Una glicosidasa GH3 capaz de operar a bajo pH podría trabajar con un amplio rango de grupos funcionales en forma neutra, como por ejemplo los ácidos carboxílicos o

35

fosfónicos. Estos ácidos serían aniones a pH más próximos a 7, susceptibles en ese estado de sufrir repulsión electrostática y no resultar válidos para los mutantes de glicosidasas descritos en la técnica.

5 De acuerdo a esto, los inventores han seleccionado las β -glicosidasas BxTW1 y BGL-2 citadas en el capítulo anterior para obtener las correspondientes tioglicoligasas. Estas dos enzimas son representativas por tener un tercer residuo ácido en el centro activo y capacidad para operar a pH muy bajo. Este tercer residuo es el E91 en la forma recombinante de BxTW1 (SEQ. ID NO: 3) y el D59 en el caso de la forma recombinante
10 de BGL-2 (SEQ. ID NO: 8).

En la BxTW1 recombinante se mutó el residuo catalítico y se comprobó si era capaz de unir carbohidratos a aceptores distintos a los descritos. El resultado fue que además de los ácidos fórmico, acético e hidrazoico, descritos como aceptores en su forma de
15 aniones pequeños y el bencenotiol, un nucleófilo fuerte, funcionaban como aceptores válidos más de cincuenta compuestos de naturaleza muy diversa (tabla 2). El estado del arte no identifica a estos compuestos como aceptores para tioglicoligasas, a excepción de los compuestos con grupo funcional $-OH$ que pueden ser aceptores exclusivamente de tioglicoligasas de tipo alfa, con la problemática ya descrita anteriormente.

20

Los inventores confirmaron que los grupos funcionales de los aceptores que se van a glicosilar entran neutros en el centro activo evitando así cualquier eventual repulsión electrostática. Una vez ahí, probablemente ceden un protón al tercer residuo ácido, pasando a forma aniónica y convirtiéndose así en mejores nucleófilos capaces de recibir
25 la molécula de carbohidrato.

La presente invención describe por tanto β -glicosidasas de la familia GH3 mutadas en el residuo catalítico. En un aspecto preferible de la invención la β -glicosidasa sobre las
30 que se efectúa la mutación es la β -xilosidasa denominada BxTW1. En otro aspecto preferible, es en la β -glucosidasa denominada BGL-2.

A efectos de la presente invención, una glicosidasa es una enzima con la capacidad de romper y/o formar enlaces glicosídicos.

35

A efectos de la presente invención los términos “glicosidasa” y “glicosidasa con retención de la configuración” se usarán indistintamente para referirse a las enzimas que rompen y/o forman enlaces glicosídicos con la misma configuración anomérica que el sustrato o donador.

5

A efectos de la presente invención el término “ β -glicosidasa” hace referencia al tipo de glicosidasas capaces de romper y/o formar enlaces glicosídicos con configuración β . A efectos de la presente invención el término “ α -glicosidasa” hace referencia al tipo de glicosidasas capaces de romper y/o formar enlaces glicosídicos con configuración α .

10

A efectos de la presente invención, los términos “aminoácido nucleófilo”, “residuo nucleófilo” y “residuo que lleva a cabo el ataque nucleófilo” se utilizan indistintamente para referirse al aminoácido del centro activo de una glicosidasa con retención de la configuración, que por una cesión de electrones forma un nuevo enlace con el carbono anomérico de un carbohidrato implicado en un enlace *O*-glicosídico con un grupo saliente. La formación del nuevo enlace provoca la ruptura del *O*-glicosídico, la liberación del grupo saliente y la formación del intermediario enzima-sustrato. Esta definición se basa en el mecanismo típico del doble desplazamiento propuesto para glicosidasas silvestres del tipo de retención de la configuración propuesto por Koshland (Koshland, D.E., “Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions”, 1953. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 28, 416-436).

15

20

A efectos de la presente invención, los términos “catalizador ácido/base general”, “residuo para la catálisis ácido/base” o “residuo catalítico” se utilizan indistintamente para referirse al aminoácido del centro activo de una glicosidasa con retención de la configuración que actúa primero donando un protón al grupo saliente que se libera tras la acción del residuo nucleófilo y luego aceptando un protón del agua o aceptor que rompe el intermediario enzima-sustrato. Esta definición también se basa en el mecanismo típico del doble desplazamiento definido arriba.

25

30

A efectos de la presente invención, glicosilación significa la transferencia catalizada enzimáticamente de una unidad de carbohidrato, preferiblemente monosacárido, desde un compuesto denominado donador a otro denominado aceptor.

A efectos de la presente invención, los términos “glicósido” y “glicoconjugado” se utilizan indistintamente y se refieren al compuesto formado por la unión de un carbohidrato a una molécula no glucídica por enlace covalente. Los términos “xilósido” y “derivado xilopiranosido” se utilizan indistintamente para el caso específico de los glicoconjugados cuya unidad de carbohidrato es un residuo de xilopiranososa. El término “derivado arabinopiranosido” se utiliza para el caso específico de los glicoconjugados cuya unidad de carbohidrato es un residuo de arabinopiranososa. El término “derivado arabinofuranósido” se utiliza para el caso específico de los glicoconjugados cuya unidad de carbohidrato es un residuo de arabinofuranosa. Los términos “glucósido” y “derivado glucopiranosido” se utilizan para el caso específico de los glicoconjugados cuya unidad de carbohidrato es un residuo de glucopiranososa.

A efectos de la presente invención, el término “gen β -xilosidasa” se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica la β -xilosidasa BxTW1 de *Talaromyces amestolkiae* y se identifica por la SEQ. ID NO: 1. La forma nativa madura de dicha enzima comprende la secuencia aminoacídica codificada por el gen β -xilosidasa, sin incluir el péptido señal y se identifica con la SEQ. ID NO: 2. La forma recombinante de la enzima comprende la secuencia madura y dos aminoácidos extra en el extremo N-terminal producto de la estrategia de clonaje y se identifica con la SEQ. ID NO: 3.

A efectos de la presente invención, el término “rBxTW1” se refiere a la forma recombinante de la β -xilosidasa BxTW1 de *T. amestolkiae*, expresada en *P. pastoris*, que mantiene los aminoácidos ácidos nucleófilo y catalítico sin mutar.

A efectos de la presente invención, el término “gen tioxiloligasa” se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica la forma recombinante de β -xilosidasa BxTW1 de *T. amestolkiae* con el reemplazo del codón que codifica el ácido glutámico catalítico por el que codifica alanina y se identifica por la SEQ. ID NO: 4. La forma tioglicoligasa de dicha enzima comprende la secuencia aminoacídica del gen tioxiloligasa y se identifica por la SEQ. ID NO: 5 y en la presente invención se denomina indistintamente **tioxiloligasa** y rBxTW1-E495A.

A efectos de la presente invención, el término “grupo saliente” se refiere al fragmento de una molécula que se desliga del resto tras la ruptura de un enlace. En particular, “buen grupo saliente” se refiere a cualquier grupo saliente cuya unión covalente al carbono

anomérico de un carbohidrato sea termodinámicamente menos estable que la del enlace *O*-glicosídico establecido entre el carbono anomérico de dicho carbohidrato y un segundo carbohidrato que cumpla la fórmula general $C_m(H_2O)_n$, siendo “m” y “n” números enteros independientes.

5

En un donador de la tioxiloligasa, un “buen grupo saliente” es cualquier grupo saliente cuya unión covalente al carbono anomérico de un carbohidrato sea termodinámicamente menos estable que la del enlace *O*-glicosídico de la xilobiosa, el disacárido considerado como sustrato principal de la β -xilosidasa en su versión silvestre.

10

En un aspecto preferible de la invención, un donador de la tioxiloligasa es un compuesto con un buen grupo saliente unido covalentemente al carbono anomérico de un carbohidrato.

15

El alcance de la presente solicitud también contempla aquellas variantes de las SEQ. ID. NO:1, SEQ. ID. NO:2, SEQ. ID. NO:3, SEQ. ID. NO:4, SEQ. ID. NO:6, SEQ. ID. NO:7, SEQ. ID. NO:8 y/o SEQ. ID. NO:9 con, al menos, un 70% 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con las mismas. Un aspecto preferible de la invención son unas secuencias con estos mismos porcentajes de identidad respecto de las SEQ. ID. NO:5 y SEQ. ID. NO:10

20

Los donadores pueden contener carbohidratos de distinto grado de polimerización, pero preferiblemente son trisacáridos, más preferiblemente disacáridos y aún más preferiblemente un monosacárido. Entre los monosacáridos, los más preferibles para la tioxiloligasa son la β -D-xilopiranososa, α -L-arabinopiranososa o α -L-arabinofuranosa.

25

En un aspecto más preferible el buen grupo saliente del donador de la tioxiloligasa es fenol o un derivado de tipo fenólico, un éster carboxílico, un fosfoéster, una sulfona, un haluro de glicosilo preferiblemente flúor, o azida de glicosilo.

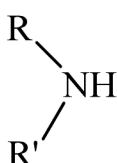
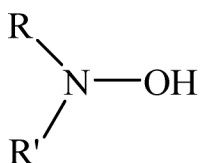
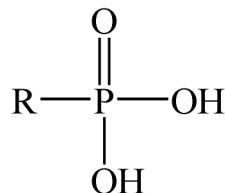
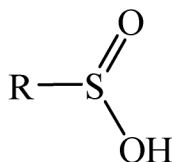
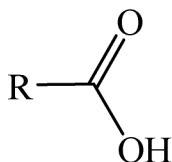
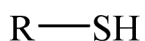
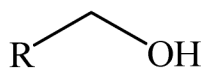
30

A efectos de la presente invención, los términos “derivado de tipo fenólico” “compuestos fenólicos” o “fenoles” se usan indistintamente y se refieren a cualquier compuesto con un grupo –OH unido a un carbono aromático.

Cualquier derivado de tipo fenólico se ajusta a la definición de buen grupo saliente y sería un aspecto preferible de la presente invención. En la técnica se describen derivados fenólicos que se pueden encontrar unidos a carbohidratos, ya sea en compuestos naturales o artificiales. Además del fenol, que es el compuesto fenólico más sencillo, otros ejemplos son bencenodiolos, bencenotrioles, metoxifenoles, dimetoxifenoles, nitrofenoles, dinitrofenoles, naftoles, quercetina, fluorofenoles, clorofenoles, bromofenoles, metilumbeliferona, 1-hidroxietilfenoles, 2-hidroxietilfenoles, hidroxibenzaldehídos, ácidos hidroxibenzoicos, ácido gálico, o combinaciones de ellos en distintas posiciones del anillo aromático. Cuando se mencionan ácidos se hace referencia a unión entre carbohidrato y derivado fenólico a través del grupo hidroxilo.

En un aspecto más preferible aún, los donadores de la tioxiloligasa son el *p*-nitrofenil β -D-xilopiranosido (*p*NPX), *p*-nitrofenil α -L-arabinopiranosido (*p*NPAP) y *p*-nitrofenil α -L-arabinofuranosido (*p*NAF).

Aceptores válidos para las enzimas mutadas de la presente invención pueden ser cualquier molécula orgánica cuyas propiedades de masa molecular, estructura espacial y solubilidad sean compatibles con la aproximación de un grupo funcional glicosilable al intermediario enzima-sustrato en un medio de reacción acuoso, que opcionalmente puede incluir cosolventes. Dicho grupo funcional, para ser considerado glicosilable, debe tener un valor de pK_a dentro del intervalo de 1 a 10. En un aspecto preferible los aceptores son moléculas orgánicas con un tamaño dentro del intervalo de 18 Da a 458 Da que presenten un grupo funcional cuyo valor de pK_a se encuentre dentro del intervalo de 1 a 10. En una realización más preferible estos grupos funcionales presentan un valor de pK_a dentro del intervalo de 2 a 9. En una realización todavía más preferida estos grupos funcionales son los siguientes:



Las excepciones serían aquellos compuestos que cumplan estos requisitos, pero presenten una carga positiva o negativa cercana capaz de interactuar con el centro activo. Dicha carga previsiblemente sufrirá una repulsión electrostática que impedirá la aproximación del grupo funcional glicosilable al intermediario enzima-sustrato. Compuestos con estas características no resultarían aceptores válidos, por ejemplo muchos iones dipolares. En cambio, sí podrán funcionar como aceptores aquellos compuestos que presenten una carga positiva o negativa en alguno de sus átomos pero ésta no se encuentre suficientemente próxima para interactuar con el centro activo, por ejemplo el ácido 5-aminolevulínico.

Excepciones por tanto serían el ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES) y *L*-glicina, que presentan valores de pK_a dentro de los límites adecuados para el mutante pero para los que no se detectaron glicósidos ni en cromatografía en capa fina (*Thin Layer Chromatography*, TLC) ni por espectrometría de masas de tipo ionización por electrospray (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, ESI-MS). Estos dos compuestos presentan estructura de ion dipolar (portadores a la vez de carga positiva y carga negativa) o zwitterión. En estos casos, cuando el grupo glicosilable se encuentra en estado neutro existe una carga positiva próxima, lo que previene el acceso de estos compuestos al centro activo impidiendo que puedan funcionar como aceptores. Una carga negativa próxima tendría el mismo efecto inhibitorio.

Por otra parte, hay aceptores válidos para los que no se detecta la formación de glicoconjugado. Esto ocurre cuando el producto formado no es estable en las condiciones de reacción, un fenómeno esperable para ciertos aceptores particularmente reactivos como por ejemplo el ácido fórmico, ácido bencenoselenínico o la *N*-hidroxisuccinimida.

Un pH de medio de reacción inferior pero cercano al pK_a del grupo funcional glicosilable permite alcanzar los máximos niveles de conversión de aceptor a glicoconjugado. A ese pH se requiere una menor concentración de aceptor para maximizar la actividad específica en los ensayos de rescate de actividad. Con un valor de pH superior al pK_a pero todavía próximo (no más de 2 unidades de diferencia) se observa un descenso en el rendimiento de conversión, y en algunos perfiles de rescate de actividad no se alcanza el plato de actividad máxima, aunque otros mantienen una forma similar. Para estos valores de pH respecto a pK_a se entiende que, aunque el aceptor se encuentre mayoritariamente en su forma aniónica, la cantidad de forma neutra todavía es suficiente para llevar a cabo la reacción. Por el contrario, si el valor se encuentra por encima de este límite los niveles de conversión del aceptor en glicoconjugado se reducen drásticamente o totalmente; del mismo modo, no se obtienen los “perfiles de rescate de actividad”.

A efectos de la presente invención, los “perfiles de actividad” se definen como el incremento en la actividad específica de la tioglicoligasa causada por el aumento de la concentración del aceptor. En estos perfiles, la representación de la actividad específica (variable dependiente) frente a la concentración de aceptor (variable independiente) adopta la forma de una hipérbola rectangular, con un plato de actividad máxima. Por encima del límite de dos unidades por encima del pK_a este plato de actividad específica no se alcanza.

Por otra parte, un pH de reacción muy por debajo del valor del pK_a (más 4,5 unidades de diferencia) impide la desprotonación del aceptor en el centro activo, condición necesaria para que sea posible la ruptura del intermediario enzima-sustrato y la formación del glicoconjugado, de modo que no se observa conversión y no se obtienen perfiles de rescate de actividad.

La relación entre pK_a y pH es el núcleo de la actividad de rBxT1-E495A. La acidez de la reacción debe, además de estar en el rango de la actividad y estabilidad de la enzima,

mantener el grupo funcional glicosilable del aceptor en un equilibrio desplazado a su forma neutra y permitir la desprotonación del aceptor en el centro activo.

5 La colección de glicósidos obtenida por el procedimiento de la invención es la más diversa utilizando un mismo biocatalizador. La lista de productos incluye *O*-, *N*-, *S*- y *Se*-glicósidos junto a ésteres y fosfoésteres de xilosa. Dentro de los *O*-glicósidos existen no solo enlaces $C_{xilosa}-O-C_{aceptor}$, sino también $C_{xilosa}-O-N_{aceptor}$. La evaluación global de los resultados indica que la influencia del pK_a es muy superior a la de la estructura particular de cada compuesto probado.

10

Por otra parte, el término “gen β -glucosidasa” se refiere en la presente invención a una secuencia nucleotídica que codifica una β -glucosidasa BGL-2 de *T. amestolkiae* y se identifica por la SEQ. ID NO: 6. La forma nativa madura de dicha enzima comprende la secuencia aminoacídica codificada por el gen β -glucosidasa, sin incluir el péptido señal
15 y se identifica con la SEQ. ID NO: 7. La forma recombinante de la enzima comprende la secuencia madura y dos aminoácidos extra en el extremo N-terminal producto de la estrategia de clonaje y se identifica con la SEQ. ID NO: 8.

A efectos de la presente invención, el término “rBGL-2” se refiere a la forma
20 recombinante de la β -glucosidasa de *T. amestolkiae*, expresada en *P. pastoris* que mantiene los aminoácidos nucleófilo y catalítico sin mutar.

En la presente invención, el término “gen tioglucoligasa” se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica la forma recombinante de dicha β -glucosidasa de *T.*
25 *amestolkiae* con el reemplazo del codón que codifica el ácido glutámico catalítico por el que codifica alanina y se identifica por la SEQ. ID NO: 9. La forma tioglucoligasa de dicha enzima comprende la secuencia aminoacídica del gen tioglucoligasa y se identifica por la SEQ. ID NO: 10 y en la presente invención se denomina indistintamente **tioglucoligasa** y rBGL-2-E446A.

30

Desde un punto de vista teórico y dado que las dos moléculas presentan un perfil de actividad similar, se puede presumir que los aceptores válidos para la tioxiloligasa son también los mismos que para la tioglucoligasa, y del mismo modo la relación entre el pH de la reacción y el pK_a del aceptor está sometida a los mismos requisitos especificados
35 para la tioxiloligasa.

5 En un donador de la tioglucoligasa, un “buen grupo saliente” es cualquier grupo saliente cuya unión covalente al carbono anomérico de un carbohidrato sea termodinámicamente menos estable que la del enlace *O*-glicosídico de la celobiosa, el disacárido considerado como sustrato principal de la β -glucosidasa en su versión silvestre.

10 En un aspecto preferible los donadores de la tioglucoligasa son compuestos con un buen grupo saliente unidos covalentemente al carbono anomérico de un carbohidrato.

Los donadores pueden contener carbohidratos de distinto grado de polimerización, pero preferiblemente son trisacáridos, más preferiblemente disacáridos y aún más preferiblemente un monosacárido. Entre los monosacáridos, el más preferible para la tioglucoligasa es la β -D-glucopiranososa.

15 En un aspecto más preferible el buen grupo saliente del donador de la tioglucoligasa es fenol o un derivado de tipo fenólico, un éster carboxílico, un fosfoéster, una sulfona, un haluro de glicosilo preferiblemente flúor, o azida de glicosilo.

20 En otro aspecto aún más preferible, el donador de la tioglucoligasa es el *p*-nitrofenil β -D-glucopiranosido (*p*NPG).

25 El infrecuente perfil de pH de BxTW1 y BGL-2 permite trabajar en condiciones muy ácidas en que compuestos de pK_a bajo como ácidos carboxílicos, fosfónicos o sulfínicos están en forma neutra. La combinación del tercer residuo ácido de las glicosidasas GH3 con este perfil de pH permite ampliar el rango de posibles aceptores hipotéticamente a prácticamente cualquier molécula orgánica con un pK_a de aproximadamente entre 1 y 10, más preferiblemente entre 2 y 9.

30 La hipótesis planteada en la descripción de la presente invención es extensible a otras enzimas de la familia GH3. Se puede extrapolar desde el punto de vista teórico que otras enzimas de este grupo con características similares a las descritas van a mostrar un perfil similar de potenciales aceptores.

- Los resultados del Ejemplo 16 sugieren que la presente invención es extensible a otras glicosidasas que cumplan el requisito de permitir el paso de forma neutra a aniónica de un determinado aceptor en su centro activo, por ejemplo por la presencia de un tercer residuo ácido como en el caso de la familia GH3. De acuerdo a lo expuesto en el Ejemplo
- 5 12 la conversión de un determinado aceptor en su glicósido será óptima a un valor de acidez al cual el grupo funcional glicosilable del aceptor se encuentre desplazado a su forma neutra pero no muy por debajo de su valor de pK_a , y se podrá llevar a cabo siempre y cuando el biocatalizador seleccionado sea activo al pH seleccionado.
- 10 A efectos de la presente invención, la expresión “gen heterólogo” se refiere a la introducción de un gen extraño, en un organismo con el fin de modificar su material genético y los productos de expresión. Dicho organismo es preferiblemente una levadura metilotrófica, más preferiblemente *Pichia pastoris*.

15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La **Figura 1** muestra la evolución de las actividades específicas de rBxTW1 y rBxTW1-E495A en un rango de concentraciones de azida (A) y formiato (B) sódicos. La actividad de la enzima silvestre está referida al eje y(a) y la del mutante al eje y(b). Los puntos negros y línea discontinua representan la actividad específica de rBxTW1 y los puntos

20 blancos y línea continua representan la actividad específica de rBxTW1-E495A.

La **Figura 2** muestra resultados de ensayos de rescate de actividad utilizando una serie de potenciales aceptores seleccionados a valores de concentración crecientes. La actividad de la enzima silvestre está referida al eje y(1) y la del mutante al eje y(2). Los

25 puntos negros y línea discontinua representan la actividad específica de rBxTW1 y los puntos blancos y línea continua representan la actividad específica de rBxTW1-E495A. Cada aceptor se ensayó a un pH determinado en función de su pK_a y del rango de actividad de la enzima: El ácido etanosulfónico ($pK_a = -1,68$) se ensayó a pH 2,2 (A), el ácido fenilfosfónico ($pK_a = 1,42$) se ensayó a pH 2,2 (B); el ácido bencenosulfínico ($pK_a = 2,76$) se ensayó a pH 2,2 (C); el ácido fórmico ($pK_a = 3,75$) se ensayó a pH 3,0 (D); el

30 ácido bencenoselenínico ($pK_a = 4,70$) se ensayó a pH 3,0 (E); el ácido hidrazoico ($pK_a = 4,72$) se ensayó a pH 3,0 (F); la *N*-hidroxisuccinimida ($pK_a = 6,09$) se ensayó a pH 5,5 (G); la vanillina ($pK_a = 7,40$) se ensayó a pH 5,5 (H); el 1*H*-1,2,3-triazol[4,5-*b*]piridina ($pK_a = 8,70$) se ensayó a pH 5,5 (I); el 1*H*-1,2,3-triazol ($pK_a = 9,26$) se ensayó a pH 5,5

(J); la acetofenona oxima ($pK_a = 11,48$) se ensayó a pH 5,5 (K); la D-glucosa ($pK_a = 12,46$) se ensayó a pH 5,5 (L).

La **Figura 3** muestra resultados de ensayos de rescate de actividad utilizando como
 5 acceptor el ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico a valores de concentración crecientes. La actividad de la enzima silvestre está referida al eje y(1) y la del mutante al eje y(2). Los puntos negros y línea discontinua representan la actividad específica de rBxTW1 y los puntos blancos y línea continua representan la actividad específica de rBxTW1-E495A. La reacción se llevó a cabo a pH 3,0.

10

La **Figura 4** analiza el efecto del pH de reacción sobre aceptores con valores de pK_a en los extremos del rango propuesto como adecuado para la actividad del mutante. Los puntos negros y línea discontinua representan los ensayos a pH 2,2. Los puntos blancos y línea continua representan los ensayos a pH 3,0. Los puntos negros y línea continua
 15 representan los ensayos a pH 5,5. A) Perfiles de producción de distintos xilósidos a lo largo del tiempo utilizando rBxTW1-E495A. Se representa la conversión del acceptor en el correspondiente xilósido. Como aceptores se utilizaron ácido bencenosulfínico ($pK_a = 2,76$) (a); 5-(5-bromo-2-tienil)-1*H*-tetrazol ($pK_a = 3,57$) (b); vanillina ($pK_a = 7,40$) (c); 1*H*-1,2,3-triazol[4,5-*b*]piridina ($pK_a = 8,70$) (d). B) Resultados de ensayos de rescate de actividad utilizando una serie de potenciales aceptores seleccionados a valores de
 20 concentración crecientes. Se representa la actividad específica del mutante. Como aceptores se utilizaron 5-trifluorometil-2*H*-tetrazol ($pK_a = 2,27$) (e); ácido bencenosulfínico ($pK_a = 2,76$) (f); vanillina ($pK_a = 7,40$) (g); 1*H*-1,2,3-triazol[4,5-*b*]piridina ($pK_a = 8,70$) (h).

25

La **Figura 5** muestra perfiles de producción de distintos xilósidos a lo largo del tiempo utilizando rBxTW1-E495A. Los puntos blancos y línea continua representan la conversión del acceptor en condiciones de pH controlado. Los puntos negros y línea discontinua representan la conversión del reactivo limitante en condiciones de pH no controlado. El valor pH controlado de cada reacción se seleccionó en función del pK_a
 30 del acceptor correspondiente y del rango de actividad del mutante: El xilósido de vanillina ($pK_a = 7,40$) se produjo a pH 5,5 (A); el xilósido de EGCG ($pK_a = 7,75$) se produjo a pH 5,5 (B); el xilósido de ácido *trans*-cinámico ($pK_a = 4,44$) se produjo a pH 3,0 (C); el xilósido de *N*-hidroxibenzotriazol ($pK_a = 4,60$) se produjo a pH 3,5 (D); el xilósido de 3,5-
 35 dibromotriazol ($pK_a = 5,50$) se produjo a pH 5,0 (E); el xilósido de bencenotiol ($pK_a =$

6,62) se produjo a pH 5,5 (F); el xilósido de ácido bencenosulfínico ($pK_a = 2,76$) se produjo a pH 2,2 (G), el xilósido de bencenoselenol ($pK_a = 4,73$) se produjo a pH 3,5 (H); el xilósido de ácido fosfórico ($pK_a = 2,12$) se produjo a pH 2,2 (I).

- 5 La **Figura 6** muestra el perfil de producción del derivado arabinopiranosido de la vanillina a lo largo del tiempo utilizando rBxTW1-E495A. Los puntos blancos y línea continua representan la conversión del aceptor en condiciones de pH controlado. Los puntos negros y línea discontinua representan la conversión del aceptor en condiciones de pH no controlado. Teniendo en cuenta el rango de actividad la enzima y que la vanillina
10 presenta un pK_a de 7,40 se utilizó 5,5 como valor de pH controlado.

SECUENCIAS APORTADAS

- SEQ. ID NO: 1 – secuencia nucleotídica que codifica la β -xilosidasa BxTW1 de *Talaromyces amestolkiae*.
- 15 SEQ. ID NO: 2 - secuencia aminoacídica de la β -xilosidasa BxTW1 nativa madura.
SEQ. ID NO: 3 - forma recombinante de la β -xilosidasa BxTW1 de *Talaromyces amestolkiae*, que incluye dos aminoácidos extra en el extremo N-terminal producto de la estrategia de clonaje.
- SEQ. ID NO: 4 - secuencia nucleotídica que codifica la forma recombinante de β -xilosidasa BxTW1 de *T. amestolkiae* con el reemplazo del codón que codifica el
20 ácido glutámico catalítico por el que codifica alanina en posición 495.
- SEQ. ID NO: 5 - secuencia aminoacídica de la **tioxiloligasa** rBxTW1-E495A.
- SEQ. ID NO: 6 - secuencia nucleotídica que codifica la β -glucosidasa BGL-2 de *T. amestolkiae*.
- 25 SEQ. ID NO: 7 - secuencia aminoacídica de la β -glucosidasa BGL-2 nativa madura.
SEQ. ID NO: 8 - forma recombinante de la enzima β -glucosidasa BGL-2 que comprende la secuencia madura y dos aminoácidos extra en el extremo N-terminal producto de la estrategia de clonaje.
- SEQ. ID NO: 9 - secuencia nucleotídica que codifica la forma recombinante de la
30 β -glucosidasa BGL-2 de *T. amestolkiae*, con el reemplazo del codón que codifica el ácido glutámico catalítico por el que codifica alanina en posición 446.
- SEQ. ID NO: 10 - secuencia aminoacídica de la **tioglucoligasa** rBGL-2-E446A.
- SEQ. ID NO: 11 – Cebador sentido sobre la SEQ ID NO: 1.
- SEQ. ID NO: 12 – Cebador antisentido sobre la SEQ ID NO: 1.
- 35 SEQ. ID NO: 13 – Cebador sentido sobre la SEQ ID NO: 6.

SEQ. ID NO: 14 – Cebador antisentido sobre la SEQ ID NO: 6.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

5 Materiales

Los compuestos *N*-hidroxisuccinimida, *N*-hidroxiftalimida, *N*-hidroxibenzotriazol, 6-cloro-1-hidroxibenzotriazol, 1*H*-1,2,3-triazol[4,5-*b*]piridina, 4-fenilurazol, 3,5-dibromo-1,2,4-triazol, 3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol, 5-clorobenzotriazol, 1,2,4-triazol[4,3-*a*]piridin-3(2*H*)-ona y 1*H*-benzotriazol se compraron a TCI Chemicals. El 5-trifluorometil-2*H*-tetrazol se adquirió a Flurochem. Si no se especifica lo contrario el resto de reactivos utilizados en estos ensayos se compraron a Sigma-Aldrich.

Medidas de actividad enzimática y cantidad de proteína

Las actividades β -xilosidasa y β -glucosidasa se midieron espectrofotométricamente por la liberación de *p*-nitrofenol (*p*NP) ($\epsilon_{410} = 15.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a partir de *p*NPX y *p*NPG respectivamente. La mezcla de reacción estándar contenía una concentración de 3,5 mM de sustrato, tampón acetato sódico (pH 5) a 50 mM, un 0,1% de seroalbúmina bovina (BSA), y la dilución apropiada de la enzima purificada en un volumen final de 200 μL . Los ensayos estándar se incubaban a 40 °C para la β -xilosidasa y 50 °C para la β -glucosidasa, a 1200 rpm durante 5 y 10 min para confirmar la linealidad de la actividad medida, y las reacciones se detenían con la adición de 500 μL de Na_2CO_3 al 2% (p/v). Una unidad de actividad β -xilosidasa o β -glucosidasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para la liberación de 1 μmol de *p*NP por minuto en las condiciones especificadas en el ensayo.

25

Se escogió el método del ácido bicinconínico (BCA) para la cuantificación de proteínas, utilizando el Pierce™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar.

30 Identificación del residuo para la catálisis ácido/base, mutagénesis de sitio dirigido y clonación y producción de mutantes

El residuo para la catálisis ácido/base de BxTW1 se identificó por un alineamiento con la enzima JMB19063, una β -glucosidasa de la familia 3 (referencia 3U48 en Protein Data Bank). Esta β -glucosidasa se seleccionó con la herramienta SWISS-MODEL

35

(<https://swissmodel.expasy.org/>) como la glicosidasa más cercana a BxTW1, entre aquellas en las que se encontraban identificados el residuo nucleófilo y el catalítico ácido/base.

- 5 Se diseñaron cebadores en base a SEQ. ID NO: 1 para realizar una mutagénesis de sitio dirigido. El diseño de los cebadores se llevó a cabo automáticamente con la herramienta PrimerX (<http://www.bioinformatics.org/primerx/>) y las secuencias obtenidas fueron las siguientes: sentido SEQ. ID NO: 11 y antisentido SEQ. ID NO: 12.
- 10 La construcción pPICW1N (pPIC9:bxtw1) se sometió a mutagénesis de sitio dirigido y se amplificó por PCR. Esta construcción está formada por el gen maduro de la β -xilosidasa silvestre ligado al vector comercial de Invitrogen pPIC9, en el cual su expresión queda bajo el control de un promotor inducible por metanol (Nieto-Domínguez et al., 2016). La mezcla de reacción contenía 50 ng de ADN plasmídico pPICW1N como
- 15 molde, 10 μ L de tampón de PCR (5X Phusion HF Buffer de Thermo Fisher Scientific) que incluye $MgCl_2$ y deoxinucleósidos trifosfato para alcanzar unas concentraciones finales de 1,5 mM y 0,2 mM respectivamente, 0,5 μ M de cada cebador, y 2 U de polimerasa (Phusion High-Fidelity de Thermo Fisher Scientific) en un volumen final de 50 μ L. La mezcla de reacción se desnaturalizó a 98 °C durante 30 s y luego se sometió
- 20 a 18 ciclos de amplificación, cada uno de ellos constando de un paso de 98 °C de 10 s seguido de 58 °C durante 20 s y 72 °C durante 5,5 minutos. Finalmente se aplicó un paso de extensión final de 72 °C durante 10 minutos. El producto de PCR se digirió utilizando la endonucleasa *DpnI* que hidroliza el ADN parental y se utilizó para transformar células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5 α . El ADN plasmídico
- 25 extraído de estas células transformadas se linealizó con la enzima de restricción *SacI* (Thermo Fisher Scientific) y se utilizó a su vez para transformar células electrocompetentes de *P. pastoris* GS115. Las colonias transformadas se crecieron con en placas de medio Yeast Nitrogen Base en ausencia de histidina como marcador de selección.
- 30 El mismo procedimiento con pequeñas variaciones se aplicó para la obtención del mutante de BGL-2. El residuo para la catálisis ácido base se identificó por un alineamiento frente a cuatro β -glucosidasas cristalizadas de la familia GH3 (referencias 4IIB, 5JU6, 3ZYZ y 5FJJ en Protein Data Bank). Los cebadores utilizados se diseñaron
- 35 frente a la SEQ. ID NO: 6 y presentaron las siguientes secuencias: sentido SEQ. ID NO:

13 y antisentido SEQ. ID NO: 14. Como ADN molde para llevar a cabo la mutagénesis de sitio dirigida se utilizó la construcción pPIC9:bgl-2 (Méndez-Líter et al., 2017). La mezcla de reacción para PCR contenía 200 ng de ADN molde, 5 μ L de tampón (Buffer 2 Expand Long Template PCR System de Roche) que incluye $MgCl_2$ para alcanzar una
5 concentración final de 2,75 mM, 0,2 mM de deoxinucleósidos trifosfato, 0,5 μ M de cada cebador, y 5 U de polimerasa (Expand Long Template Enzyme mix de Roche) en un volumen final de 50 μ L. La mezcla de reacción se desnaturalizó a 94 °C durante 30 s y luego se sometió a 20 ciclos de amplificación, cada uno de ellos constando de un paso de 94 °C de 30 s, seguido de 50 °C durante 30 s y 68 °C durante 10 minutos. Finalmente
10 se aplicó un paso de extensión final de 68 °C durante 10 minutos. Como en el caso anterior el producto de PCR se trató con *DpnI* y se utilizó para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α . El ADN plasmídico extraído a continuación se linealizó digiriendo con la endonucleasa *SaI* y se utilizó a su vez para transformar células quimiocompetentes de *P. pastoris* KM71. Las colonias transformantes se
15 identificaron por causar la reversión de la auxotrofia a histidina.

De la transformación de *P. pastoris* normalmente se obtienen clones que muestran distintos niveles de expresión de la proteína de interés, debido, principalmente al sitio de inserción del gen y al número de copias insertadas. Por lo tanto, se seleccionaron 6
20 clones de cada mutante para analizar su producción. Las colonias se cultivaron en tubos de 50 mL con 10 mL de medio YEPS (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 10 g/L de sorbitol y 100 mM de tampón fosfato potásico pH 6). Los cultivos se incubaron a 28 °C y 250 rpm y se añadió diariamente metanol para alcanzar una concentración final de 5 g/L, como inductor de la expresión génica. Se incluyeron controles de las
25 cepas de *P. pastoris* utilizadas sin transformar. La producción de ambas tioglicoligasas se analizó cargando los sobrenadantes de cultivos de cinco días en geles SDS-PAGE al 10% y comparando la intensidad de la banda proteica correspondiente a la masa molar esperada para rBxTW1-E495A y rBGL-2-E446A. Se cargó la misma cantidad de proteína en cada caso para evaluar diferencias únicamente al nivel de la producción de
30 la tioglicoligasa.

Los mutantes rBxTW1-E495A y rBGL-2-E446A se produjeron y purificaron siguiendo los procedimientos descritos para sus variantes recombinantes silvestres (Méndez-Líter et al., 2017; Nieto-Domínguez et al., 2016). Todos los ensayos posteriores se realizaron
35 utilizando las enzimas purificadas.

Caracterización del mutante rBxTW1-E495A

Las cinéticas de la tioxiloligasa se analizaron frente a *p*NPX. Se añadió la cantidad apropiada de biocatalizador en las condiciones estándar, pero utilizando
5 concentraciones crecientes del sustrato mencionado desde 0,078 hasta 20 mM. Los datos de actividad determinados se ajustaron a una hipérbola rectangular de dos parámetros (modelo de Michaelis-Menten) utilizando el software SigmaPlot versión 10.0.

La tioxiloligasa y la β -xilosidasa silvestre se compararon en un ensayo de rescate de
10 actividad, en el que se utilizaron 3,5 mM de *p*NPX, 50 mM de tampón 2-(*N*-morfolino)etanosulfonato sódico (MES) a pH 5,5 y concentraciones crecientes de formiato sódico (de 0 a 5 M) y de azida sódica (de 0 a 2 M). Ambos compuestos son conocidos por ser buenos nucleófilos y se prepararon neutralizados a pH 5,5 para evitar que sus altas concentraciones afectaran a la capacidad tamponante del MES.

15

Análisis de aceptores de rBxTW1-E495A

Para demostrar el potencial de la tioxiloligasa para catalizar la glicosilación de distintos aceptores de naturaleza diversa. Todas las reacciones se prepararon con 40 mM de *p*NPX como donador y la tioxiloligasa a 4 g/L. El ensayo se llevó a cabo a 40 °C y 1200
20 rpm durante 1 hora. La reacción se detuvo calentando a 100 °C durante 5 minutos salvo para aquellos aceptores cuyo hipotético glicoconjugado era considerado especialmente lábil: ácido fórmico, ácido fosfórico, L-glicina, ácido L-glutámico, ácido *N*-acetil-L-glutámico, *N*-hidroxisuccinimida, 5-trifluorometil-2*H*-tetrazol y ácido fenilfosfónico. En estos casos la reacción se detuvo en hielo y la presencia de producto se comprobó
25 rápidamente por TLC. Los aceptores se probaron a una concentración final de 100 mM siempre que fue posible. Este valor se redujo en los casos en los que el aceptor era inhibitorio para la actividad enzimática. Los stocks de aceptor que mostraban una baja solubilidad se prepararon con el cosolvente orgánico más apropiado. Para evitar la inhibición de la tioglicoligasa el contenido de cosolvente en la reacción se limitó a un
30 máximo de 10% (v/v) para etanol y metanol y al 5% (v/v) para acetonitrilo y DMSO. El caso particular del 5-(5-bromo-2-tienil)-1*H*-tetrazol incluyó un 7% (v/v) de dimetilformamida (DMF) por ser el solvente en el que viene disuelto este compuesto en el preparado comercial. Las reacciones se llevaron a cabo sin tampón para evitar cualquier posible competencia del propio compuesto tamponante con el aceptor
35 ensayado. Sin embargo, la acidez inicial en cada reacción se analizó y se ajustó a un

valor cercano, pero inferior al pK_a del aceptor en los casos necesarios. Este ajuste se llevó a cabo bien de forma aproximada con tiras de pH o bien con la ayuda de un pHmetro cuando se disponía de la suficiente cantidad de aceptor. Para modificar el pH se utilizaron las cantidades apropiadas de HCl o NaOH y se mantuvo siempre dentro del

5 rango de pH de 2 a 5,5 en el que la enzima se mantiene activa y estable. La formación de cada hipotético nuevo xilósido se comprobó por TLC, utilizando la solución de carrera más acorde con la polaridad esperada del producto, y se confirmó por espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*, MS). La tabla 2 muestra los aceptores analizados, que representan diferentes aspectos de la presente invención, y las condiciones de cada

10 ensayo. Los números de algunos de ellos corresponden a la numeración en el ejemplo 9.

Tabla 2. Aceptores ensayados: valores de pKa y condiciones del análisis.

Aceptor	pKa	Referencia del valor de pKa	pH inicial	[Aceptor]	Bufere de carrera ^c	Cosolvente
Ácido L-glutámico	2,10; 4,07; 9,47	(1)	2,0 y 3,0	50% saturación	A	-
L-Glicina	2,35; 9,78	(1)	2,0	100 mM	A	-
Ácido N-Acetil-L-glutámico (1)	3,45 ; 4,29	-	3,0	100 mM	A	-
Ácido fórmico	3,75	(1)	3,0	100 mM	A	-
Ácido 5-aminolevulínico	3,90; 8,05	(2)	~3	100 mM	A	-
Ácido <i>trans</i> -cinámico (2)	4,44	(1)	~4	10% saturación	B	Etanol
Ácido acético	4,76	(1)	4,0	100 mM	B	-
Ácido propiónico	4,87	(1)	4,0	100 mM	B	-
Ácido butírico	4,82	(1)	4,0	100 mM	B	-
Ácido nicotínico	4,82	(1)	~4	100 mM	B	-
Ácido pentanoico	4,86	(1)	4,0	100 mM	C	Etanol
Ácido hexanoico (3)	4,88	(1)	4,0	100 mM	C	Etanol
Ácido heptanoico (4)	4,89	(1)	4,0	100 mM	C	Etanol
Ácido octanoico	4,95	(1)	4,0	10% saturación	C	Etanol
Ácido cólico	5,08	(3)	~5	10% saturación	C	Etanol
Ácido gálico	4,24; 8,27; 9,23	(20)	~4	10% saturación	C	Etanol
Ácido <i>p</i> -cumárico (17)	4,39; 8,37	(20)	~4	10% saturación	B	Etanol
Ácido sinápico	4,40; 9,21	(20)	~4	10% saturación	B	Etanol
Ácido cafeico	4,47; 8,32	(20)	~4	10% saturación	B	Etanol
Ácido ferúlico (18)	4,56; 8,65	(20)	~4	10% saturación	B	Etanol
Quercetina	5,54; 6,95; 8,21; 9,77	(4)	~5	10% saturación	C	Metanol
Silibinina	7,00; 8,77; 9,57; 11,66	(5)	~5	5% saturación	C	DMSO
Vanillina (5)	7,40	(1)	~5	25 mM	C	Etanol
Epigallocatequin galato (EGCG) (6)	7,75; 8,0	(6)	~5	25 mM	C	-

Metil 4-hidroxibenzoato	8,31	-	~5	100 mM	C	Etanol
Pirgalol	9,01; 11,64	(1)	~5	100 mM	C	-
2,6-Dihidroxi-naftaleno	9,55	-	~5	20 mM	B	Acetonitrilo
2,6-Dimetoxifenol	9,95	(7)	~5	100 mM	C	Etanol
Pterostilbeno	9,96	-	~5	5% saturación	C	DMSO
Fenol	9,99	(1)	~5	100 mM	C	-
D-Xilosa	12,29	(8)	~5	100 mM	A	-
D-Glucosa	12,46	(8)	~5	100 mM	A	-
6-Cloro-1-hidroxibenzotriazol	4,15	(9)	~4	10% saturación	C	Metanol
Ácido violúrico	4,57	(10)	~4	10% saturación	B	Etanol
N-Hidroxibenzotriazol (7)	4,60	(9)	~4	100 mM	C	Etanol
N-Hidroxisuccinimida	6,09	(9)	~5	100 mM	A, B, C	-
N-Hidroxifalimida	6,32	(9)	~5	50% saturación	C	-
Acetofenona oxima	11,48	(10)	~5	100 mM	C	Etanol
5-Trifluorometil-2H-tetrazol	2,27	-	~2	20 mM	B	-
5-(5-Bromo-2-tienil)-1H-tetrazol (8)	3,57 ^a	-	~3	10% saturación	C	Etanol+DMF
Ácido hidraico (9)	4,72	(11)	4,0	100 mM	A	-
4-Fenilurazol	5,29	(12)	~5	50% saturación	C	-
3,5-Dibromo-1,2,4-triazol (10)	5,50	-	~5	10% saturación	B	Etanol
3-Nitro-1H-1,2,4-triazol	5,92	-	~5	10% saturación	C	Etanol
5-Clorobenzotriazol	7,7	(13)	~5	10% saturación	C	Etanol
1,2,4-Triazol[4,3-a]piridin-3(2H)-ona	7,86	-	~5	10% saturación	C	Etanol
1H-Benzotriazol	8,2	(13)	~5	100 mM	C	Etanol
1H-1,2,3-Triazol[4,5-b]piridina (11)	8,70	-	~5	10% saturación	C	Metanol
1H-1,2,3-Triazol	9,26	(14)	~5	100 mM	C	-
1H-1,2,4-Triazol	10,04	(14)	~5	100 mM	C	-
Ácido fenilfosfónico (12)	1,42; 6,92	(15)	~2	100 mM	A	-
Ácido fosfórico (13)	2,12; 7,21; 12,32	(11)	2,0	100 mM	A	-
Bencenotiol (14)	6,62	(16)	~5	10% saturación	C	Metanol

Ácido benzenosulfónico (15)	2,76	(17)	~3	100 mM	C	-
Ácido metanosulfónico	-1,92	(18)	~2	20 mM	A	-
Ácido etanosulfónico	-1,68	(18)	~2	20 mM	A	-
Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)etanosulfónico	6,15	(19)	~5	100 mM	A, B, C	-
Bencenoselenol (16)	4,73	-	~5	10% saturación	C	Metanol
Ácido bencenoselenínico	4,70	(17)	~4	100 mM	A, B, C	-

^a Valores predichos en SciFinder

^b Valores predichos en ChemAxon

^c A: 1-Butanol/ácido acético/H₂O 3:1:1 (v/v); B: Etil acetato/metanol/H₂O 10:2:1 (v/v); C: Cloroformo/metanol/ácido fórmico 50:10:1 (v/v)

1. Sergeant, E.P. and Dempsey, B., 1979. Ionisation constants of organic acids in aqueous solution.
2. Elfsson, B. y col., 1999. Stability of 5-aminolevulinic acid in aqueous solution. *Eur. J. Pharm. Sci.* 7, 87-91.
3. Roda, A. y Fini, A., 1984. Effect of nuclear hydroxy substituents on aqueous solubility and acidic strength of bile acids. *Hepatology* 4, 72S-76S.
4. Escandar, G.M. and Sala, L.F., 1991. Complexing behavior of rutin and quercetin. *Can. J. Chem.* 69, 1994-2001.
5. Meloun, M. y col., 2003. Thermodynamic dissociation constants of silychristin, silybin, silydianin and mycophenolate by the regression analysis of spectrophotometric data. *Anal. Chim. Acta* 486, 125-141.
6. Jovanovic, S.V. y col., 1995. Antioxidant potential of galocatechins. A pulse radiolysis and laser photolysis study. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 9881-9888.
7. Ragnar y col., 2000. pKa-Values of guaiacyl and syringyl phenols related to lignin. *J. Wood Chem. Technol.* 20, 277-305.
8. Izatt, R.M., y col., 1966. Thermodynamics of proton dissociation in dilute aqueous solution. V. An entropy titration study of adenosine, pentoses, hexoses, and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 88, 2641-2645.
9. Koppel, I., y col., 1993. The acidity of substituted 1-hydroxybenzotriazoles in water and dimethyl-sulfoxide. *J. Chem. Res. S:*446-447.
10. Bell, R.P. y Higginson, W.C.E., 1949. The catalyzed dehydration of acetaldehyde hydrate, and the effect of structure on the velocity of protolytic reactions. *Proc. R. Soc. Lond. A Math. Phys. Sci.* 197, 141.
11. Jencks, P. y Regenstein, J. Ionization Constants of Acids and Bases, in: Sober, M.A. (Ed.), *Handbook of Biochemistry Chemical Rubber Company.*, Cleveland. Pp. 595-635.
12. Ohashi, S. y col., 1980. Ene reaction of triazolinediones with alkenes. 1. Structure and properties of products. *J. Org. Chem.* 45, 3467-3471.
13. Fagel, J.E. and Ewing, G.W., 1951. The ultraviolet absorption of benzotriazole. *J. Am. Chem. Soc.* 73, 4360-4362.

14. Hansen, L.D., West, B.D., Baca, E.J., Blank, C.L., 1968. Thermodynamics of proton ionization from some substituted 1,2,3-triazoles in dilute aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 6588-&.
15. Franz, R.D., 2001. Comparisons of pKa and log P values of some carboxylic and phosphonic acids: Synthesis and measurement . *AAPS Pharm. Sci.* 3,
16. De Maria, P., Fini, A., Hall, F.M., 1973. Thermodynamic acid dissociation-constants of aromatic thiols. *J. Chem. Soc. Perkin* 21969-1971.
17. Defilippo, D. and Momicchioli, F., 1969. A study of benzenesulfonic and seleninic acids determination and theoretical interpretation of pK. *Tetrahedron* 25, 5733-5744.
18. Albert, A. and Serjeant, E.P., 1962. Ionization constants of acids and bases; a laboratory manual. 66, 882.
19. Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S., Singh, R.M.M., 1966. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 5, 467-477.
20. Erdemgil, F.Z., Sanli, S., Sanli, N., Özkan, G., Barbosa, J., Guiteras, J., Beltrán, J.L. 2007. Determination of pKa values of some hydroxylated benzoic acids in methanol-water binary mixtures by LC methodology and potentiometry. *Talanta* 72, 489-496.

Ensayos de rescate de actividad de rBxTW1-E495A

Se realizaron ensayos de rescate de actividad frente a una selección de potenciales aceptores en un rango de pK_a amplio utilizando la tioxiloligasa y la enzima silvestre a modo de control. Los ensayos se realizaron utilizando ácido etanosulfónico, ácido fenilfosfónico y ácido bencenosulfínico a pH 2,2 en 50 mM de tampón glicina-HCl, ácido fórmico, ácido bencenoselenínico y ácido hidrazoico a pH 3 en 50 mM de tampón glicina-HCl, *N*-hidroxisuccinimida, vanillina, 1*H*-1,2,3-Triazol[4,5-*b*]piridina, 1*H*-1,2,3-triazol, acetofenona oxima y D-glucosa a pH 5,5 en 50 mM de tampón MES. Las reacciones se llevaron siguiendo el protocolo anteriormente descrito para el ensayo estándar con los cambios indicados para el tampón y añadiendo cantidades crecientes del aceptor hasta un máximo de 200 mM. Esta concentración se redujo en aquellos casos en los que el aceptor presentaba baja solubilidad, causaba una fuerte inhibición de la enzima y/o interfería con la medida de *p*NP, pero manteniendo siempre un valor máximo de al menos 20 mM por ser esta la concentración utilizada en los ensayos de rendimiento de glicosilación. Se añadió el cosolvente necesario para cada aceptor según lo referido en la tabla 2 y se mantuvo el contenido de cosolvente indicado para todas las concentraciones del aceptor, incluyendo los controles sin aceptor o sin tioxiloligasa y los ensayos con la enzima silvestre.

20 Análisis de rendimiento de glicosilación con rBxTW1-E495A

El rendimiento de producción de xilósidos utilizando la tioxiloligasa se estudió con una selección de aceptores representativos de cada grupo funcional glicosilado: vanillina, EGCG, ácido *trans*-cinámico, ácido bencenosulfínico, *N*-hidroxibenzotriazol, 3,5-dibromo-1,2,4-triazol, bencenotiol, bencenoselenol y ácido fosfórico. Las condiciones de reacción se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis de rendimiento de glicosilación: Condiciones de reacción.

Aceptor	Cosolvente	[Aceptor]	[<i>p</i> NPX]	Condiciones		
				pH no controlado	pH controlado	
				Inicial	pH	Tampón
Vanillina	Etanol	20 mM	40 mM	~5	5,5	MES
EGCG	-			~5	5,5	MES
Ácido <i>trans</i> -cinnámico	Etanol			~3	3,0	Glicina-HCl
Ácido bencenosulfínico	-			~2	2,2	Glicina-HCl

<i>N</i> -Hidroxibenzotriazol	Etanol			~4	3,5	Glicina-HCl
3,5-Dibromo-1,2,4-triazol	Etanol			~5	5,0	MES
Bencenotiol	Metanol			~5	5,5	MES
Bencenoselenol	Metanol			~3	3,0	Glicina-HCl
Ácido fosfórico	-	80 mM		~2	2,2	Glicina-HCl

Los cosolventes se añadieron a una concentración final de 10% (v/v). La producción del xilósido correspondiente se estudió a lo largo del tiempo hasta un máximo de 4 horas de reacción, comparando el efecto de controlar o no el pH. En los casos *N*-hidroxibenzotriazol y 3,5-dibromo-1,2,4-triazol la concentración del tampón se elevó de los 50 mM iniciales hasta 100 mM, por estar actuando en las regiones límites de sus respectivas capacidades de amortiguamiento. Los rendimientos se determinaron por cromatografía líquida de alta eficacia (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) como se describe posteriormente y se expresaron en términos de conversión de aceptor (%)
 Este protocolo fue el seguido para todos los aceptores listados en la tabla 3, con la excepción del ácido fosfórico. Para este compuesto en particular se consideró que la conversión del donador era un parámetro más interesante debido al alto valor del *p*NPX en comparación con el del ácido fosfórico. Además, la formación del fosfoéster se siguió por RMN en lugar de por HPLC por lo que, para asegurar la monitorización de la reacción en sus estadios iniciales la concentración de enzima se disminuyó hasta 1 g/L y la producción se llevó a cabo a 37 °C a lo largo del tiempo hasta un máximo de 24 h.

Análisis de la relación entre pK_a del aceptor y pH de la glicosilación catalizada por rBxTW1-E495A

Con el objetivo de comprender mejor la relación entre la actividad del mutante, el pH de la reacción y el pK_a del compuesto diana se realizaron una serie de rescates de actividad y ensayos de rendimientos de glicosilación adicionales comparando el efecto de tamponar las reacciones a pH 2,2, 3 (50 mM glicina-HCl) y 5,5 (50 mM MES).

Para los rescates de actividad se utilizaron 5-trifluorometil-2*H*-tetrazol, ácido bencenosulfínico, vanillina y 1*H*-1,2,3-triazol[4,5-*b*]piridina y el ensayo se realizó como está descrito anteriormente.

Los ensayos de rendimiento de glicosilación se realizaron frente a 5-(5-bromo-2-tienil)-1*H*-tetrazol, ácido bencenosulfónico, vanillina y 1*H*-1,2,3-triazol[4,5-*b*]piridina manteniendo en todos los casos una concentración final de 20 mM de aceptor y realizando el ensayo en las condiciones descritas anteriormente.

5

Ejemplo 1. Producción de xilósidos a partir de ácidos hidroxycinámicos

La glicosilación de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico se estudió por metodología de respuesta en superficie. Se generó una matriz experimental de Diseño Central Compuesto (Central Composite Design, CCD) utilizando el programa Design-Expert® versión 10.0.1.0 (Stat-Ease Inc.) y como variables independientes se seleccionaron las concentraciones de *p*NPX, enzima y NaOH junto con el tiempo de reacción y la temperatura. El hidróxido sódico se empleó para ajustar el pH inicial de la reacción. El espacio experimental del diseño se definió ajustando estos parámetros a 3 niveles: bajo, medio y alto, que fueron determinados por ensayos de tipo un factor cada vez, aunque el diseño CCD también incluyó puntos más allá de estos límites. La concentración del aceptor se fijó en 25 mM y la producción de cada uno de los tres posibles glicósidos (dos mono-xilósidos y un di-xilósido) se registraron como respuestas (tablas 4 y 5).

15

20

Tabla 4. Diseño experimental CCD para la producción de xilósidos a partir de ácido *p*-cumárico.

[<i>p</i> NPX] (mM)	T (°C)	[Enzima] (g/L)	[NaOH] (mM)	Tiempo (min)	[<i>p</i> -Cumaril xilósido] ^a (mM)	[<i>p</i> -Cumaril xilósido] ^b (mM)	[<i>p</i> -Cumaril xilósido] ^c (mM)
30	16	5	10	75	3,25	7,30	1,09
10	30	2	5	30	1,61	3,31	0,26
10	30	2	15	30	1,49	4,31	0,20
50	30	2	5	30	8,08	2,14	0,93
50	30	2	15	30	7,24	3,29	0,91
10	30	8	5	30	0,41	4,97	0,11
10	30	8	15	30	0,32	6,28	0,06
50	30	8	5	30	5,57	7,48	2,59
50	30	8	15	30	4,33	10,59	2,12
10	30	2	5	120	0,57	5,33	0,15
10	30	2	15	120	0,52	6,70	0,11

ES 2 777 398 A1

50	30	2	5	120	6,77	7,28	2,77
50	30	2	15	120	5,37	6,89	1,59
10	30	8	5	120	0,09	2,92	0,00
10	30	8	15	120	0,08	4,04	0,00
50	30	8	5	120	2,56	15,84	2,60
50	30	8	15	120	1,99	18,90	2,10
30	40	5	0	75	1,94	10,44	0,99
30	40	5	22	75	1,84	11,91	0,77
0	40	5	10	75	0,00	0,00	0,00
70	40	5	10	75	4,52	13,52	3,54
30	40	0	10	75	0,00	0,00	0,00
30	40	12	10	75	0,63	12,34	0,33
30	40	5	10	15	4,24	6,47	1,12
30	40	5	10	180	0,75	13,53	0,40
0	40	5	10	75	1,60	13,23	0,95
30	40	5	10	75	1,69	14,06	0,96
30	40	5	10	75	1,45	13,60	0,90
30	40	5	10	75	1,60	13,62	0,92
30	40	5	10	75	1,58	13,71	0,95
30	40	5	10	75	1,63	13,55	0,98
30	40	5	10	75	1,51	13,60	0,93
30	40	5	10	75	1,51	13,41	0,91
10	50	2	5	30	2,75	1,59	0,14
10	50	2	15	30	1,49	3,86	0,18
50	50	2	5	30	7,78	1,28	0,49
50	50	2	5	30	6,25	1,02	0,27
10	50	8	5	30	0,80	3,39	0,09
10	50	8	15	30	0,32	4,70	0,04
50	50	8	5	30	7,45	3,64	1,56
50	50	8	15	30	4,92	5,10	1,18
10	50	2	5	120	2,61	2,21	0,19

10	50	2	15	120	1,31	4,65	0,16
50	50	2	5	120	9,19	2,16	1,02
50	50	2	15	120	7,50	2,39	0,73
10	50	8	5	120	0,39	1,28	0,01
10	50	8	15	120	0,14	2,04	0,00
50	50	8	5	120	7,29	3,77	1,61
50	50	8	15	120	5,51	9,19	1,97
30	64	5	10	75	2,59	0,23	0,01

^a Xilósido producto de la unión de una xilopiranososa al grupo carboxilo del ácido *p*-cumárico.

^b Xilósido producto de la unión de una xilopiranososa al grupo hidroxilo del ácido *p*-cumárico.

^c Xilósido producto de la unión de una xilopiranososa al grupo carboxilo y la unión de otra xilopiranososa al grupo hidroxilo del ácido *p*-cumárico.

Tabla 5. Diseño experimental CCD para la producción de xilósidos a partir de ácido ferúlico.

[<i>p</i> NPX] (mM)	T (°C)	[Enzima] (g/L)	[NaOH] (mM)	Tiempo (min)	[Feruloil xilósido] ^a (mM)	[Feruloil xilósido] ^b (mM)	[Feruloil xilósido] ^c (mM)
35	16	4	7,5	45	4,92	7,29	1,65
20	30	6	15	60	1,38	15,03	0,88
50	30	6	0	60	4,69	13,48	4,91
50	30	6	15	60	2,12	21,53	3,45
20	30	2	15	60	1,89	13,22	1,04
20	30	2	15	30	2,26	10,37	0,92
50	30	6	0	30	5,94	10,79	4,38
50	30	2	15	30	3,94	11,38	2,26
50	30	2	0	60	6,56	7,73	3,32
20	30	2	0	30	3,02	4,95	1,00
50	30	6	15	30	2,71	18,78	3,26
20	30	2	0	60	2,80	6,69	1,48
20	30	6	0	60	2,07	7,93	1,25
20	30	6	15	30	1,64	14,33	1,01
50	30	2	0	30	6,77	4,66	1,62

ES 2 777 398 A1

50	30	2	15	60	3,25	16,51	3,06
20	30	6	0	30	2,52	7,84	1,35
35	40	4	7,5	45	3,01	14,36	2,85
35	40	4	7,5	45	3,04	14,11	2,77
35	40	4	7,5	45	3,04	14,08	2,80
35	40	4	7,5	9	4,88	7,23	1,79
35	40	0	7,5	45	0,00	0,00	0,00
35	40	4	7,5	45	3,00	13,96	2,70
35	40	4	7,5	45	3,00	13,33	2,63
35	40	9	7,5	45	2,17	13,17	1,94
35	40	4	25	45	1,05	7,14	0,52
0	40	4	7,5	45	0,00	0,00	0,00
35	40	4	7,5	45	2,91	14,00	2,70
35	40	4	7,5	45	2,95	13,97	2,69
35	40	4	0	45	4,02	11,57	2,95
71	40	4	7,5	45	4,32	14,92	5,66
35	40	4	7,5	81	2,75	15,40	2,50
35	40	4	7,5	45	2,84	13,28	2,55
20	50	6	0	60	2,68	7,45	0,87
20	50	2	15	60	1,73	11,59	0,81
50	50	6	15	30	3,76	11,31	2,31
20	50	2	0	60	3,32	5,36	1,04
50	50	6	0	30	6,82	6,60	2,77
20	50	6	0	30	2,23	6,57	1,07
50	50	2	15	30	5,01	5,78	1,43
20	50	2	0	30	3,49	4,18	0,76
20	50	6	5	30	1,70	10,74	0,74
50	50	2	0	60	6,90	3,90	1,23
20	50	6	15	60	1,30	10,75	0,57
50	50	2	0	30	6,51	3,27	0,90
50	50	6	15	60	3,58	12,15	2,41

50	50	2	15	60	4,73	6,91	1,76
50	50	6	0	60	6,73	8,08	3,46
20	50	2	15	30	2,47	8,27	0,80
35	64	4	7,5	45	3,93	1,61	0,21

^a Xilósido producto de la unión de una xilopiranososa al grupo carboxilo del ácido ferúlico.

^b Xilósido producto de la unión de una xilopiranososa al grupo hidroxilo del ácido ferúlico.

^c Xilósido producto de la unión de una xilopiranososa al grupo carboxilo y la unión de otra xilopiranososa al grupo hidroxilo del ácido ferúlico.

5

El programa utilizó estos datos para generar ecuaciones polinomiales cuadráticas que integrasen el efecto de las variables independientes en la respuesta, de forma que pudieran utilizarse para predecir las condiciones de máxima producción del xilósido seleccionado.

10

Ejemplo 2. Producción de derivados arabinofuranósido y arabinopiranósido utilizando rBxTW1-E495A

Se estudió la síntesis de glicósidos reemplazando *p*NPX por 4-nitrofenil- α -L-arabinofuranósido (*p*NPAf) y 4-nitrofenil- α -L-arabinopiranósido (*p*NPAp) como donadores. Como aceptor se seleccionó vanillina y se utilizaron las condiciones de reacción recogidas para el análisis de los aceptores de la tabla 2 manteniendo la concentración de estos nuevos donadores también a 40 mM y la del aceptor a 25 mM, pero extendiendo el tiempo de reacción hasta 4 y 16 h. El derivado arabinopiranósido se purificó por HPLC según ejemplo 5 para su posterior identificación por resonancia magnética nuclear (RMN) según ejemplo 7.

El rendimiento de la síntesis del derivado arabinopiranósido de vanillina se estudió en las mismas condiciones que las de su equivalente xilósido, pero incrementando el tiempo de reacción hasta 16 h.

25

Ejemplo 3. Producción de glucósidos utilizando rBGL-2-E446A

Se estudió la síntesis de glucoconjugados utilizando el mutante tioglucoligasa. Como aceptores se seleccionaron bencenotiol, EGCG, *N*-hidroxibenzotriazol y 3,5-dibromo-1,2,4-triazol y se utilizaron las condiciones de reacción descritas para el análisis de los aceptores de la tabla 2, manteniendo la concentración del biocatalizador, en este caso rBGL-2-E446A, pero extendiendo el tiempo de reacción a 16 h.

30

La formación del glucósido de bencenotiol se validó analizando directamente la mezcla de reacción por ESI-MS mientras que en el resto de derivados glucosilados fueron previamente purificados por HPLC según el ejemplo 5.

5 **Ejemplo 4. Ensayos de cromatografía en capa fina**

La técnica de cromatografía en capa fina o TLC se seleccionó para i) comprobar de manera sencilla la formación o no de un nuevo xilósido o glucósido a partir de los aceptores seleccionados ii) realizar una purificación preliminar previa al análisis de espectrometría de masas y, en algunos casos, iii) purificar completamente la cantidad
10 requerida del producto para su identificación por RMN según el ejemplo 7.

Las TLCs de tipo analítico se llevaron a cabo utilizando gel de sílice G/UV250 sobre láminas de poliéster (0,2 mm de grosor y dimensiones de 40 × 80 mm) obtenidas de Macherey-Nagel. Las soluciones de carrera se escogieron en función de la polaridad
15 esperada para cada hipotético nuevo xilósido o glucósido en comparación con las del resto de componentes de la mezcla de reacción (tabla 2). La visualización del *p*NP, *p*NPX o *p*NPG y cualquier otro aceptor o producto aromático se realizó bajo luz UV de 254 nm. A continuación, azúcares y glicósidos (aromáticos o no) se detectaron por la
20 inmersión de las membranas en una solución de metanol/ácido sulfúrico 95/5 (v/v) para ser reveladas por calor a una temperatura de 110 °C durante 10 min. Los resultados se evaluaron comparando el patrón de manchas de la reacción con el de un control sin enzima. Las reacciones utilizando rBxTW1-E495A se compararon también con un control que contenía una mezcla de xilosa, *p*NPX y *p*NP. Las reacciones utilizando
25 rBGL-2-E446A se compararon también con un control que contenía una mezcla de glucosa, *p*NPG y *p*NP.

Para evitar que otros componentes de la reacción interfirieran en el posterior análisis de espectrometría de masas, la mayor parte de las reacciones se sometieron a un paso de purificación parcial por TLC. La técnica se llevó a cabo según el protocolo descrito por
30 Robyt (2000) con pequeñas modificaciones. Las soluciones de carrera y las membranas fueron idénticas a las del análisis cualitativo. La banda de los glicoconjugados aromáticos se detectó a 254 nm siempre que fue posible y en el resto de glicósidos su posición en la membrana se detectó por comparación con un análisis TLC cualitativo revelado como se ha descrito anteriormente. Se retiró el sílice de la zona del hipotético
35 producto y se añadió a una solución de 1 mL de etanol/agua 85:15 (v/v) que se sonicó

para mejorar la solubilización de los compuestos unidos al sílice. Las soluciones de extracción se centrifugaron a $20.000 \times g$ durante 5 min. Los sobrenadantes se secaron por centrifugación al vacío y se redisolieron en 50 μL de 10 mM tampón acetato sódico pH 5. Por el contrario, las reacciones que incluían silibinina, ácido cafeico y ácido sinápico fueron analizadas directamente por MS sin realizar este paso de purificación parcial, con el objetivo de detectar cualquier posible di- o tri-xilósido de carácter minoritario.

Finalmente, la modalidad preparativa de TLC se seleccionó como una forma rápida de purificar aquellos productos sin un grupo aromático que permitiese su monitorización en el rango del UV cercano o medio. En este caso el ensayo se realizó en gel de sílice 60 F₂₅₄ sobre láminas de aluminio (0,2 mm de grosor y dimensiones de 20 \times 20 cm) adquiridos a Merck. Se utilizaron estas láminas de mayores dimensiones para incrementar la cantidad de muestra cargada y al mismo tiempo conseguir una separación entre bandas suficiente para lograr la purificación completa del producto deseado. En este caso la banda del producto de interés se localizó por comparación con una tira de 10 mm de ancho que se cortó y se reveló como se ha descrito anteriormente. El sílice extraído se añadió a una solución de 5 mL de etanol/agua 85:15 (v/v) y se sonicó. Las suspensiones se centrifugaron a $20.000 \times g$ durante 10 min y los sobrenadantes se secaron por centrifugación al vacío y se redisolieron en 500 μL de agua deuterada. Específicamente se utilizaron TLCs preparativas para purificar los xilósidos de los ácidos hexanoico, heptanoico, *N*-acetil-L-glutámico, fosfórico y fenilfosfónico. Este último pese a ser aromático presentaba una purificación compleja por HPLC debido a su muy bajo pK_a , motivo por el que se optó por la TLC preparativa. La técnica se llevó a cabo utilizando las soluciones de carrera especificadas para cada acceptor (tabla 2). Típicamente, el producto de interés se purificó de mezclas de reacción de 400 μL realizadas según lo descrito anteriormente. Se cargaron 200 μL por lámina y se utilizaron dos láminas para cada producto.

30 **Ejemplo 5. Ensayos de HPLC**

La síntesis de los xilósidos obtenidos a partir de bencenotiol, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido *trans*-cinámico, vanillina, EGCG, ácido bencenosulfónico, bencenoslenol, *N*-hidroxibenzotriazol, 5-(5-bromo-2-tienil)-1*H*-tetrazol, 3,5-dibromo-1,2,4-triazol y 1*H*-1,2,3-triazol[4,5-*b*]piridina y la del arabinopiranosido de vanillina se monitorizó por HPLC. Se elaboraron curvas de calibrado para los aglicones que se

utilizaron tanto para cuantificar su consumo como la formación de los respectivos glicósidos en base a sus áreas bajo la curva.

5 Los xilósidos y el arabinopiranosido mencionados, junto con el derivado xilopiranosido del ácido hidrazoico (todos obtenidos con rBxTW1-E495A) se purificaron por HPLC para su posterior análisis por RMN según el ejemplo 7.

10 Los glucósidos de EGCG, *N*-hidroxibenzotriazol y 3,5-dibromo-1,2,4-triazol obtenidos en reacciones catalizadas por rBGL-2-E446A se purificaron también por HPLC para ser a continuación analizados por ESI-MS.

15 Típicamente los productos deseados se aislaron a partir de 1 mL de mezcla de reacción llevada a cabo en las condiciones descritas en los apartados anteriores correspondientes y en las predichas como óptimas para el caso de los xilósidos de ácidos hidroxicinámicos (ejemplo 14). El equipo y el protocolo aplicado a cada aceptor se detallan a continuación.

20 Excepto para el derivado xilopiranosido del ácido hidrazoico los análisis de los glicósidos estudiados se realizaron utilizando un instrumento de Agilent 1200 series LC y para los estudios de purificación y cuantificación de producto se seleccionaron columnas con distintas propiedades y diferentes condiciones de elución, como se indica a continuación.

Ácido *trans*-cinámico: Derivado xilopiranosido

25 La cuantificación y la purificación del producto se realizaron por HPLC utilizando una columna Kromasil 100-5-NH₂ (4,6 × 250 mm) adquirida de Kromasil. El sistema se equilibró en metanol/H₂O 70:30 (ambos conteniendo 0,1% de ácido acético) con un flujo de 1 mL/min. La elución se realizó de forma isocrática durante 17 min. Los picos de aceptor y producto se detectaron monitorizando la absorbancia a 270 nm.

30

Ácidos ferúlico y *p*-cumárico: Derivados xilopiranosido

35 La purificación de los productos se llevó a cabo cargando las mezclas de reacción en la columna semipreparativa Mediterranea sea₁₈ TR-010006 (4,6 × 250 mm) adquirida de Teknokroma. La purificación de los xilósidos de ácido *p*-cumárico requirió equilibrar el sistema en acetonitrilo/H₂O 15,5:84,5 v/v (ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético)

y se mantuvo un flujo de 2 mL/min durante todo el proceso. Los productos se eluyeron aplicando un gradiente lineal de 13 min desde el 15,5 al 19% de acetonitrilo. A continuación, la concentración de acetonitrilo se elevó al 95% durante 4 min para lavar la columna. Finalmente, el sistema se reequilibró en las condiciones iniciales durante otros 4 min. En el caso de los xilósidos de ácido ferúlico el sistema se equilibró en acetonitrilo/H₂O 11,5:88,5 v/v (ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético) y se mantuvo un flujo de 2 mL/min durante todo el proceso. Los productos se eluyeron aplicando un gradiente lineal de 13 min desde el 11,5 al 15% de acetonitrilo. A continuación, la concentración de acetonitrilo se elevó al 95% durante 4 min para lavar la columna. Finalmente, el sistema se reequilibró en las condiciones iniciales durante otros 4 min.

La cuantificación de los productos de ambos aceptores se realizó también por HPLC, pero utilizando una columna analítica ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 × 150 mm) adquirida de Agilent. El sistema se equilibró en acetonitrilo/H₂O 10:90 v/v (ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético) con un flujo de 2 mL/min. La elución se realizó incrementando la concentración de acetonitrilo a lo largo de un gradiente lineal de 8 min desde el 10 al 20%. A continuación, la fase móvil cambió a 95% de acetonitrilo durante 3 min y finalmente a 10% durante otros 3 min para, respectivamente, lavar y reequilibrar la columna.

Para ambos ácidos hidroxicinámicos la presencia y cantidad de los correspondientes aceptores y productos se evaluó monitorizando la absorbancia a 270 nm.

25 **Vanillina: Derivado xilopiranosido**

La purificación y cuantificación del producto se realizó por HPLC utilizando la columna semipreparativa Mediterranea sea₁₈ TR-010006. El sistema se equilibró en acetonitrilo/H₂O 10:90 v/v (ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético) con un flujo de 2 mL/min. La elución se realizó incrementando la concentración de acetonitrilo a lo largo de un gradiente lineal de 9 min desde el 10 al 20%. A continuación, la fase móvil cambió a 95% de acetonitrilo durante 4 min y finalmente a 10% durante otros 4 min para, respectivamente, lavar y reequilibrar la columna. Los picos de producto y aceptor se detectaron monitorizando la absorbancia a 270 nm.

35 **Vanillina: Derivado arabinopiranosido**

La purificación y cuantificación del producto se realizó por HPLC utilizando la columna semipreparativa Eclipse Plus C18 (4,6 × 250 mm) de Agilent. El sistema se equilibró en acetonitrilo/H₂O 20:80 v/v (ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético) con un flujo de 1 mL/min. La elución se realizó incrementando la concentración de acetonitrilo a lo largo de un gradiente lineal de 9 min desde el 20 al 30%. A continuación, la fase móvil cambió a 95% de acetonitrilo durante 4 min y finalmente a 20% durante otros 5 min para, respectivamente, lavar y reequilibrar la columna. Los picos de producto y aceptor se detectaron monitorizando la absorbancia a 270 nm.

10 **ECGC: Derivado xilopiranosido**

La purificación y cuantificación del producto se realizó por HPLC utilizando la columna semipreparativa Mediterranea sea₁₈ TR-010006. El sistema se equilibró en acetonitrilo/H₂O 10:90 v/v (ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético) con un flujo de 2 mL/min. La elución se realizó incrementando la concentración de acetonitrilo a lo largo de un gradiente lineal de 12 min desde el 10 al 30%. A continuación, la fase móvil cambió a 95% de acetonitrilo durante 4 min y finalmente a 10% durante otros 4 min para, respectivamente, lavar y reequilibrar la columna. Los picos de producto y aceptor se detectaron monitorizando la absorbancia a 270 nm.

20 **ECGC: Derivado glucopiranosido**

La purificación y cuantificación del producto se realizó por HPLC utilizando la columna semipreparativa Eclipse Plus C18 de Agilent. El sistema se equilibró en acetonitrilo/H₂O 20:80 v/v (ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético) con un flujo de 1 mL/min. La elución se realizó manteniendo la concentración de acetonitrilo a lo largo de un gradiente isocrático de 6 min. A continuación, la fase móvil cambió a 95% de acetonitrilo durante 4 min y finalmente a 20% durante otros 5 min para, respectivamente, lavar y reequilibrar la columna. Los picos de producto y aceptor se detectaron monitorizando la absorbancia a 270 nm.

30 **N-Hidroxibenzotriazol: Derivado xilopiranosido**

La purificación y cuantificación del producto se realizó por HPLC utilizando la columna semipreparativa Mediterranea sea₁₈ TR-010006. El sistema se equilibró en acetonitrilo/H₂O 13:87 v/v (ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético) con un flujo de 2 mL/min. La elución se realizó reduciendo la concentración de acetonitrilo a lo largo de un gradiente lineal inverso de 8 min desde el 13 al 7%. A continuación, la fase móvil

cambió a 95% de acetonitrilo durante 4 min y finalmente a 13% durante otros 4 min para, respectivamente, lavar y reequilibrar la columna. Los picos de producto y aceptor se detectaron monitorizando la absorbancia a 220 nm.

5 **N-Hidroxibenzotriazol: Derivado glucopiranósido**

La purificación y cuantificación del producto se realizó por HPLC utilizando la columna semipreparativa Eclipse Plus C18. El sistema se equilibró en acetonitrilo/H₂O 35:65 v/v (ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético) con un flujo de 1 mL/min. La elución se realizó de modo isocrático durante 10 min. Los picos de producto y aceptor se detectaron monitorizando la absorbancia a 220 nm.

15 **5-(5-Bromo-2-tienil)-1H-tetrazol: Derivado xilopiranósido**

La purificación y cuantificación del producto se realizó por HPLC utilizando la columna semipreparativa Eclipse Plus C18. El sistema se equilibró en acetonitrilo/H₂O 45:55 v/v (ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético) con un flujo de 1 mL/min. La elución se realizó de modo isocrático durante 6 min. Los picos de producto y aceptor se detectaron monitorizando la absorbancia a 270 nm.

20 **3,5-Dibromo-1,2,4-triazol: Derivado xilopiranósido**

La purificación y cuantificación del producto se realizó por HPLC utilizando la columna semipreparativa Mediterranea sea₁₈ TR-010006. El sistema se equilibró en metanol/H₂O 65:35 v/v (ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético) con un flujo de 1 mL/min. La elución se realizó de modo isocrático durante 18 min. Los picos de producto y aceptor se detectaron monitorizando la absorbancia a 220 nm.

25

3,5-Dibromo-1,2,4-triazol: Derivado glucopiranósido

La purificación y cuantificación del producto se realizó por HPLC utilizando la columna semipreparativa Eclipse Plus C18. El sistema se equilibró en acetonitrilo/H₂O 20:80 v/v (ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético) con un flujo de 1 mL/min. La elución se realizó de modo isocrático durante 18 min. Los picos de producto se detectaron monitorizando la absorbancia a 220 nm.

30

1H-1,2,3-Triazol[4,5-b]piridina: Derivado xilopiranósido

La purificación y cuantificación del producto se realizó por HPLC utilizando la columna semipreparativa Eclipse Plus C18. El sistema se equilibró en acetonitrilo/H₂O 20:80 v/v

35

(ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético) con un flujo de 1 mL/min. La elución se realizó en modo isocrático durante 4 min. A continuación, la fase móvil cambió a 95% de acetonitrilo durante 4 min y finalmente a 20% durante otros 5 min para, respectivamente, lavar y reequilibrar la columna. Los picos de producto y aceptor se detectaron monitorizando la absorbancia a 220 nm.

Bencenotiol: Derivado xilopiranósido

La cuantificación y la purificación del producto se realizaron por HPLC utilizando una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18. El sistema se equilibró en metanol/H₂O 30:70 v/v (ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético) con un flujo de 1 mL/min. La elución se realizó incrementando la concentración de metanol a lo largo de un gradiente lineal de 8 min desde el 30 al 60%. Luego la fase móvil cambió a 99% de metanol durante 3 min y finalmente a 30% durante otros 3 min para, respectivamente, lavar y reequilibrar la columna. Los picos de aceptor y producto se detectaron monitorizando la absorbancia a 240 nm.

Ácido bencenosulfínico: Derivado xilopiranósido

La purificación y cuantificación del producto se realizó por HPLC utilizando la columna semipreparativa Mediterranea sea₁₈ TR-010006. El sistema se equilibró en acetonitrilo/H₂O 10:90 v/v (ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético) con un flujo de 2 mL/min. La elución se realizó incrementando la concentración de acetonitrilo a lo largo de un gradiente lineal de 13 min desde el 10 al 30%. A continuación, la fase móvil cambió a 95% de acetonitrilo durante 4 min y finalmente a 10% durante otros 4 min para, respectivamente, lavar y reequilibrar la columna. Los picos de producto y aceptor se detectaron monitorizando la absorbancia a 220 nm.

Bencenoselenol: Derivado xilopiranósido

La purificación y cuantificación del producto se realizó por HPLC utilizando la columna semipreparativa Mediterranea sea₁₈ TR-010006. El sistema se equilibró en metanol/H₂O 45:55 v/v (ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético) con un flujo de 1 mL/min. La elución se realizó de modo isocrático durante 7 min. A continuación, la fase móvil cambió a 99% de metanol durante 4 min y finalmente a 45% durante otros 7 min para, respectivamente, lavar y reequilibrar la columna. Los picos de producto y aceptor se detectaron monitorizando la absorbancia a 240 nm.

Ácido hidrazoico: Derivado xilopiranósido

La purificación del xilósido de ácido hidrazoico se realizó en un instrumento Agilent 1100 series con bomba cuaternaria de HPLC y detector evaporativo de dispersión de luz (Evaporative Light-Scattering Detector, ELSD) ELSD-2000ES (de Alltech). La muestra se cargó en una columna Kromasil 100-5-NH₂ termostatizada a 30 °C. Como fase móvil se seleccionó una mezcla de acetonitrilo/H₂O 95:5 v/v (ambos conteniendo un 0,1% de ácido acético) a un flujo de 1 mL/min. La elución se realizó de modo isocrático durante 15 min. El pico de producto se detectó por dispersión de luz fijando las condiciones del detector ELSD en 72,3 °C y un flujo de 1,8 L/min de nitrógeno gas. La fracción del producto de interés se recogió utilizando un divisor de flujo de tres vías (modelo Accurate, de Dionex).

Ejemplo 6. Análisis de espectrometría de masas

Las muestras se analizaron en un equipo de trampa iónica Bruker HCT Ultra, excepto aquellas en las que los aceptores eran los ácidos cafeico y sinápico, las cuales se evaluaron en un espectrómetro de masas híbrido analizador QTOF, modelo QSTAR, Pulsar I, de AB Sciex. En ambos casos las muestras se introdujeron por infusión directa utilizando electrospray (ESI-MS) con metanol como fase ionizante y se estudiaron en los modos negativo y positivo del reflector.

20

Ejemplo 7. Análisis de RMN

Los experimentos de RMN sobre los compuestos purificados se realizaron a 25 °C excepto en el caso del derivado xilopiranósido de ácido fosfórico (β -D-xilosa 1-fosfato) que se realizaron a 37 °C. Se utilizaron un espectrómetro Bruker AVANCE 500 MHz y un Bruker AVANCE 600 MHz equipado con una criosonda. Las muestras se prepararon en 500 μ L de agua deuterada.

25

Se llevaron a cabo experimentos de 1D ¹H RMN, ¹H-¹³C HSQC, HMBC, ¹H-¹H TOCSY y TOCSY selectivo con el objetivo de asignar completamente cada producto. Se utilizaron las correspondientes secuencias de pulsos incluidas en el software TOPSPIN Bruker.

30

Para el estudio cinético del derivado fosforilado de xilosa se registraron distintos espectros de 1D ¹H RMN a lo largo del tiempo.

35

Ejemplo 8. Caracterización del mutante rBxTW1-E495A

El mutante E495A de rBxTW1 se caracterizó en comparación a la enzima silvestre para comprobar los efectos de la pérdida del catalizador ácido/base general en la cinética de la enzima (tabla 6).

5

Tabla 6. Parámetros cinéticos de rBxTW1 wt y rBxTW1-E495A

Enzima	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1} s^{-1}$)
rBxTW1	0,21±0,01	20,8±0.3	69,3	335,8
rBxTW1-E495A	0,67±0,04	0,72±0.01	2,41	3,61

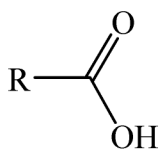
En la figura 1 se observa cómo la adición de un buen nucleófilo (azida y formiato sódicos) incrementa la actividad del mutante de una forma proporcional a su concentración, efecto que no se observa en la enzima silvestre, que incluso experimenta una considerable inhibición en las concentraciones más altas probadas para el formiato sódico.

Ejemplo 9. Análisis del rango potencial de aceptores de rBxTW1-E495A

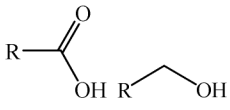
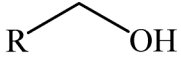
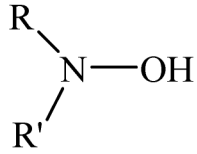
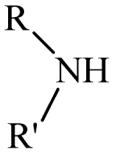
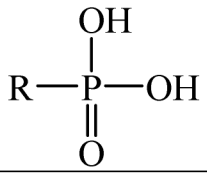
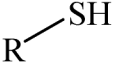
El análisis de aceptores se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones de ensayo y frente a librería de compuestos especificados anteriormente. Los resultados de los análisis por TLC y ESI-MS se recogen en la Tabla 7. La numeración de algunos aceptores corresponde con los compuestos mostrados a continuación.

20

Tabla 7. Análisis de aceptores de rBxTW1-E495A.

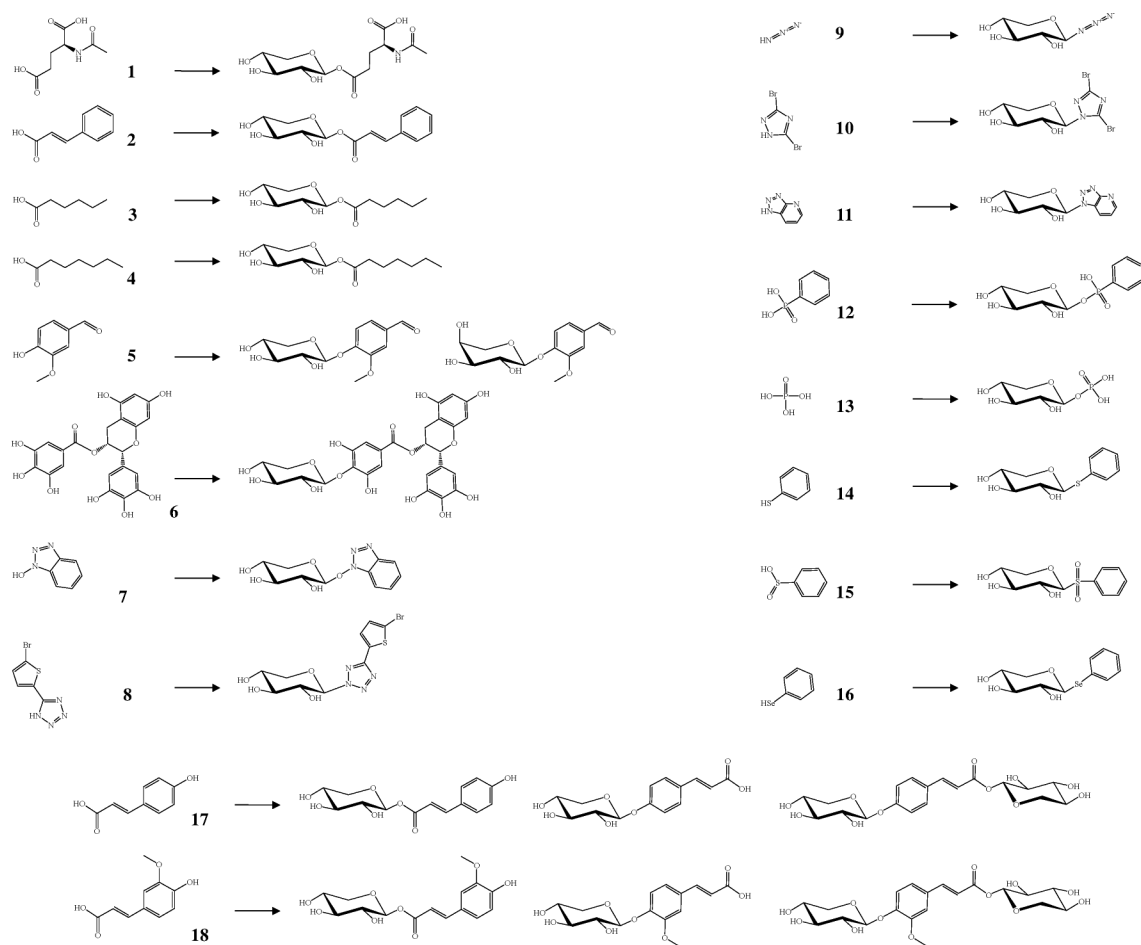
Grupo funcional	Aceptor	TLC	ESI-MS
	Ácido L-glutámico	✓	✓
	L-Glicina	x	x
	Ácido N-Acetil-L-glutámico (1)	✓	✓
	Ácido fórmico	x	x
	Ácido 5-aminolevulínico	✓	✓
	Ácido <i>trans</i> -cinámico (2)	✓	✓
	Ácido acético	✓	✓
	Ácido propiónico	✓	✓
	Ácido butírico	✓	✓
	Ácido nicotínico	✓	✓
	Ácido pentanoico	✓	✓
	Ácido hexanoico (3)	✓	✓
	Ácido heptanoico (4)	✓	✓

ES 2 777 398 A1

	Ácido octanoico Ácido cólico	✓ ✓	✓ ✓
	Ácido gálico Ácido <i>p</i> -cumárico (17) Ácido sinápico Ácido cafeico Ácido ferúlico (18)	✓ ✓ ✓ ✓ ✓	✓ ✓ ✓ ✓ ✓
	Quercetina Silibinina Vanillina (5) Epigallocatequin galato (EGCG) (6) Metil 4-hidroxibenzoato Pirogalol 2,6-Dihidroxi-naftaleno 2,6-Dimetoxifenol Pterostilbeno Fenol D-Xilosa D-Glucosa	✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ x ✓ x x x	✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ x ✓ x x
	6-Cloro-1-hidroxibenzotriazol Ácido violúrico <i>N</i> -Hidroxibenzotriazol (7) <i>N</i> -Hidroxisuccinimida <i>N</i> -Hidroxi-ftalimida Acetofenona oxima	✓ ✓ ✓ x ✓ x	✓ ✓ ✓ x ✓ x
	5-Trifluorometil-2 <i>H</i> -tetrazol 5-(5-Bromo-2-tienil)-1 <i>H</i> -tetrazol (8) Ácido hidrazoico (9) 4-Fenilurazol 3,5-Dibromo-1,2,4-triazol (10) 3-Nitro-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol 5-Clorobenzotriazol 1,2,4-Triazol[4,3- <i>a</i>]piridin-3(2 <i>H</i>)-ona 1 <i>H</i> -1,2,3-Triazol[4,5- <i>b</i>]piridina (11) 1 <i>H</i> -Benzotriazol 1 <i>H</i> -1,2,3-Triazol 1 <i>H</i> -1,2,4-Triazol	✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ x	✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓
	Ácido fenilfosfónico (12) Ácido fosfórico (13)	✓ ✓	✓ ✓
	Bencenotiol (14)	✓	✓
	Ácido bencenosulfínico (15)	✓	✓

$\text{R}-\text{S}\begin{matrix} \text{O} \\ // \\ \text{OH} \end{matrix}$			
$\text{R}-\text{S}\begin{matrix} \text{O} \\ // \\ \text{O} \\ \text{OH} \end{matrix}$	Ácido metanosulfónico Ácido etanosulfónico Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)etanosulfónico	x x x	x x x
$\text{R}-\text{SeH}$	Bencenoselenol (16)	✓	✓
$\text{R}-\text{Se}\begin{matrix} \text{O} \\ // \\ \text{OH} \end{matrix}$	Ácido bencenoselenínico	x	x

- 5 De entre los resultados positivos, para los que se confirmó la formación del glicoconjugado, se seleccionaron aceptores representativos de cada grupo funcional hipotéticamente glicosilado y se procedió a la purificación del o los productos obtenidos por TLC o HPLC como se describe en los Ejemplos 4 y 5 respectivamente.
- 10 A partir de los aceptores numerados en las tablas 2 y 7 se obtuvieron los siguientes glicoconjugados.



Los resultados ponen de manifiesto la alta promiscuidad de la tioxiloligasa.

5

Ejemplo 10. Análisis del efecto del pK_a del aceptor sobre la actividad del mutante

Se seleccionaron una serie de posibles aceptores en un rango amplio de pK_a para llevar a cabo ensayos de rescate de actividad sobre la tioxiloligasa. Se esperaba que los compuestos con constantes de disociación fuera del intervalo 2 a 9 no mostraran influencia en la actividad de la enzima, mientras que aquellos con los valores apropiados de pK_a incrementasen la actividad específica de la tioxiloligasa independientemente de que se formase un producto detectable o no. Los resultados mostrados en la figura 2 se ajustaron perfectamente a lo predicho.

15 Así, el ácido etanosulfónico ($pK_a = -1,68$), la acetofenona oxima ($pK_a = 11,48$) y la D-glucosa ($pK_a = 12,46$) no incrementaron la actividad del mutante a las mayores concentraciones ensayadas. Sí se detectó un ligero aumento en la actividad específica

para el ácido fenilfosfónico ($pK_a = 1,42$) y el 1*H*-1,2,3-triazol ($pK_a = 9,26$), mientras que los aceptores ácido bencenosulfínico ($pK_a = 2,76$), ácido hidrazoico ($pK_a = 4,72$), vanillina ($pK_a = 7,40$), 1*H*-1,2,3-triazol[4,5-*b*]piridina ($pK_a = 8,70$), ácido fórmico ($pK_a = 3,75$), ácido bencenoselenínico ($pK_a = 4,70$) y *N*-hidroxisuccinimida ($pK_a = 6,09$) muestran el perfil típico de rescate de actividad, a pesar de que no se hubiese detectado la formación de nuevo xilósido en los tres últimos. Por el contrario, solamente la glucosa llevó a un cierto incremento de la actividad de la enzima silvestre, lo que probablemente esté relacionado con el papel de este monosacárido como aceptor en reacciones convencionales de transxilosilación.

Los resultados para el ácido fenilfosfónico ($pK_a = 1,42$) y 1*H*-1,2,3-triazol ($pK_a = 9,26$) en los que sí se observa un cierto rescate de actividad, unidos a la detección de glicoconjugados para estos compuestos y algún otro de pK_a entre 9 y 10 (ejemplo 9) permiten extender el rango de pK_a de los posibles aceptores al intervalo de 1 a 10, aunque el preferido sea de 2 a 9.

Ejemplo 11. Análisis del efecto de un zwitterión en actividad del mutante

Se llevó a cabo un ensayo de rescate de actividad utilizando MES para clarificar si los iones dipolares con carga electrostática cercana al grupo funcional glicosilable podían actuar como aceptores para rBxTW1-E495A. No se observó incremento de actividad a ninguna de las concentraciones probadas a pesar de que el valor de pK_a del MES (6,15) se encuentra dentro del rango propuesto como adecuado para la actividad del mutante (figura 3). Este ensayo se suma a la ausencia de glicoconjugados detectables de este aceptor o de la L-glicina (otro ion dipolar) mostrada en la tabla 7 y de esta forma apoya la hipótesis de que la cercanía de una carga al grupo funcional potencialmente aceptor supone un gran impedimento para su glicosilación.

Ejemplo 12. Análisis del efecto del pH en la actividad de la tioglicoligasa rBxTW1-E495A

En los ejemplos anteriores los ensayos se realizaron a un valor de pH cercano pero inferior al pK_a del aceptor seleccionado (equilibrio desplazado a la forma neutra). En el ejemplo actual se llevaron a cabo ensayos de rendimiento de glicosilación (Fig. 4A) utilizando a diferentes pH por un lado ácido bencenosulfínico y 5-(5-bromo-2-tienil)-1*H*-triazol y por otro vanillina y 1*H*-1,2,3-triazol[4,5-*b*]piridina y ensayos de rescate de actividad (Fig. 4B) empleando estos mismos compuestos, pero sustituyendo el 5-(5-

bromo-2-tienil)-1*H*-tetrazol, debido a su baja solubilidad, por el 5-trifluorometil-2*H*-tetrazol, otro heterociclo de nitrógeno de pK_a bajo. Estas parejas de compuestos se seleccionaron debido a que presentan constantes de disociación en los extremos del rango determinado como adecuado para rBxTW1-E495A.

5

Ejemplo 13. Producción de xilósidos de naturaleza diversa

Con el fin de evaluar el potencial biotecnológico de rBxTW1-E495A se llevaron a cabo estudios de producción de xilósidos con al menos un ejemplo representativo de cada grupo funcional glicosilado (tabla 7). Los resultados mostrados en la figura 5 indican que algunos rendimientos son muy diferentes en función de que la acidez de la reacción se encuentre o no controlada, un hecho relacionado con que, en ausencia de tampón, la continua liberación del 4-nitrofenolato, debida al consumo del *p*NPX, puede causar un progresivo incremento del pH. Esto puede explicar que, para algunos aceptores, el rendimiento alcanzado fuese mayor en los ensayos no tamponados que en los de pH controlado (ácidos *trans*-cinámico y fosfórico). Por el contrario, y tal y como se esperaba, los compuestos que mostraban tanto una mínima capacidad autotamponante como un pK_a bajo (ácido bencenosulfínico) sufrieron un fuerte descenso en la producción de sus respectivos glicósidos cuando el pH no se sometió a un control estricto.

Ejemplo 14. Producción de glicósidos a partir de ácidos hidroxycinámicos

Los ácidos hidroxycinámicos presentan la peculiaridad de poseer grupos hidroxilos aromáticos además del grupo carboxilo. Ambos grupos funcionales son potencialmente glicosilables, pero presentan valores de pK_a distintos, correspondiendo el pK_1 al grupo carboxilo. Debido a esto, el papel como aceptores de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico se analizó en detalle utilizando una metodología de respuesta en superficie. A partir de los resultados de las matrices experimentales (tablas 4 y 5) se obtuvieron ecuaciones específicas para modelar la síntesis de cada xilósido (eq. 1-6) y se utilizaron para predecir sus respectivas condiciones de máxima producción. La tabla 8 muestra el mayor valor alcanzado en cada caso (el teórico y el experimental) junto con los rendimientos de aceptor convertido y las condiciones de reacción.

$$\begin{aligned} \text{Eq. 1) } [p\text{-Cumaroil xilósido}]_{(a)} = & + 13,24371 + 0,063618^a - 0,474652B - 0,429097C - \\ & 0,115408D - 0,0767965E + 1,448 \cdot 10^{-3}AB - 4,552 \cdot 10^{-3}AC - 2,505 \cdot 10^{-3}AD - \\ & 6,865 \cdot 10^{-5}AE + 4,387 \cdot 10^{-3}BC - 4,038 \cdot 10^{-3}BD + 9,2242 \cdot 10^{-4}BE + 2,589 \cdot 10^{-3}CD - \\ & 7,4282 \cdot 10^{-4}CE + 1,435 \cdot 10^{-4}DE + 8,12 \cdot 10^{-4a^2} + 5,348 \cdot 10^{-3}B^2 + 0,01785C^2 + \\ & 0,012344D^2 + 2,23187 \cdot 10^{-4}E^2 \end{aligned}$$

$$\text{Eq. } [p\text{-Cumaroil xilósido}]_{(b)} = -42,47449 + 0,361162A + 1,81566B + 2,39444C + 0,4174D + 0,122049E - 4,648 \cdot 10^{-3}AB + 0,026263AC + 6,86 \cdot 10^{-4}AD + 1,2190 \cdot 10^{-3}AE - 0,018562BC + 1,190 \cdot 10^{-3}BD - 1,5571 \cdot 10^{-3}BE + 0,020261CD - 1,1515 \cdot 10^{-3}CE + 3,6972 \cdot 10^{-4}DE - 5,228 \cdot 10^{-3}A^2 - 0,020941B^2 - 0,189492C^2 - 0,023225D^2 - 4,46619 \cdot 10^{-4}E^2$$

$$\text{Eq. } [p\text{-Cumaroil xilósido}]_{(c)} = -1,32626 + 0,016618A + 0,060532B + 0,161066C - 0,038399D + 9,386783 \cdot 10^{-3}E - 1,048 \cdot 10^{-3}AB + 4,197 \cdot 10^{-3}AC - 7,74 \cdot 10^{-4}AD + 1,6708 \cdot 10^{-4}AE + 6,41 \cdot 10^{-4}BC + 1,097 \cdot 10^{-3}BD - 2,917 \cdot 10^{-5}BE + 1,438 \cdot 10^{-3}CD - 6,4617 \cdot 10^{-4}CE - 6,422 \cdot 10^{-5}DE + 6,07 \cdot 10^{-4}A^2 - 8,00 \cdot 10^{-4}B^2 - 0,021517C^2 - 4,4 \cdot 10^{-5}D^2 - 4,94828 \cdot 10^{-5}E^2$$

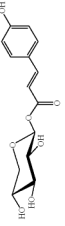
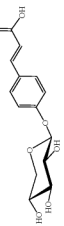
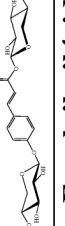

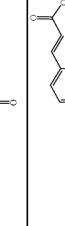
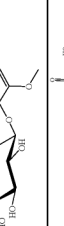
$$\text{Eq. } [\text{Feruloil xilósido}]_{(a)} = +9,84326 + 0,090276A - 0,344234B - 0,263390C - 0,036115D - 0,122384E + 1,400 \cdot 10^{-3}AB - 1,919 \cdot 10^{-3}AC - 3,903 \cdot 10^{-3}AD - 1,07 \cdot 10^{-4}AE + 3,189 \cdot 10^{-3}BC + 3,22 \cdot 10^{-4}BD + 6,24 \cdot 10^{-4}BE - 2,892 \cdot 10^{-3}CD - 4,93 \cdot 10^{-4}CE - 5,46 \cdot 10^{-4}DE - 3,08 \cdot 10^{-4}A^2 + 3,352 \cdot 10^{-3}B^2 - 0,045968C^2 + 4,305 \cdot 10^{-3}D^2 + 1,019 \cdot 10^{-3}E^2$$

$$\text{Eq. } [\text{Feruloil xilósido}]_{(b)} = -40,01301 + 0,449386A + 1,38235B + 3,28900C + 1,06373D + 0,222167E - 6,539 \cdot 10^{-3}AB + 0,027684AC + 6,94 \cdot 10^{-4}AD + 9,62 \cdot 10^{-4}AE - 0,015254BC - 0,010410BD - 1,993 \cdot 10^{-3}BE + 5,364 \cdot 10^{-3}CD - 0,010008CE - 0,001378DE - 3,781000 \cdot 10^{-3}A^2 - 0,013740B^2 - 0,267678C^2 - 0,028545D^2 - 8,08 \cdot 10^{-4}E^2$$

$$\text{Eq. } [\text{Feruloil xilósido}]_{(c)} = -7,49027 + 0,042148A + 0,272167B + 0,698395C + 0,103308D + 0,059673E - 1,608 \cdot 10^{-3}AB + 0,011936AC - 1,66 \cdot 10^{-4}AD + 6,06 \cdot 10^{-4}AE - 5,18 \cdot 10^{-4}BC + 9,02 \cdot 10^{-4}BD - 4,60 \cdot 10^{-4}BE - 0,012851CD - 3,276 \cdot 10^{-3}CE - 6,85 \cdot 10^{-4}DE + 1,50 \cdot 10^{-4}A^2 - 2,950 \cdot 10^{-3}B^2 - 0,080998C^2 - 4,991000 \cdot 10^{-3}D^2 - 3,780000 \cdot 10^{-4}E^2$$

A: [pNPX] (mM); B: Temperatura (°C); C: [Enzima] (g/L); D: [NaOH] (mM); E: Tiempo (min); a: Xilopiranososa unida al carboxilo del aceptor; b: Xilopiranososa unida al hidroxilo del aceptor; c: Xilopiranososa unida al carboxilo y xilopiranososa unida al hidroxilo del aceptor.

Tabla 8. Máxima producción de xilósidos obtenidos a partir de ácidos hidroxicinámicos: condiciones óptimas de reacción, concentración de productos (predicha y experimental) y rendimientos de conversión de aceptores (experimentales).

<i>p</i> -Cumaroil xilósido	[<i>p</i> NPX] (mM)	T (°C)	[Enzima] (g/L)	[NaOH] (mM)	Tiempo (min)	[Xilósido] _{pred} (mM)	[Xilósido] _{exp} (mM)	Conversión (%) [*] a/b/c
 (a)	50	50	2,0	5,0	30	8,18	8,17	32,7/3,9/1,1
 (b)	50	30	8,0	15	120	18,24	19,82	7,6/79,3/7,7
 (c)	50	30	7,4	5,0	119	2,78	2,28	10,0/62,6/9,1
Feruloil xilósido	[<i>p</i> NPX] (mM)	T (°C)	[Enzima] (g/L)	[NaOH] (mM)	Tiempo (min)	[Xilósido] _{pred} (mM)	[Xilósido] _{exp} (mM)	Conversión (%) [*] a/b/c
 (a)	50	50	3,4	0,0	30	6,90	5,47	21,9/21,7/8,2
 (b)	50	30	6,0	15	60	21,53	21,28	7,0/82,7/11,1
 (c)	50	30	6,0	0,3	60	4,88	4,32	15,8/50,5/17,3

* Los valores en negrita indican el xilósido cuya producción se encuentra optimizada. Cada xilósido se refiere como a, b o c en función de que la xilopiranososa se encuentre unida, respectivamente, al grupo carboxilo del aceptor, al hidroxilo o ambos.

Los modelos se validaron en base a la alta concordancia entre los valores predichos y los experimentales, junto con los test de análisis de varianza (ANOVA) presentados en la tabla 9. Las condiciones calculadas como óptimas indicaron que la glicosilación del carboxilo requería una neutralización mínima del pH mientras que se determinó que la concentración requerida de NaOH era mucho más alta cuando el proceso se dirigía a glicosilar el hidroxilo aromático. Estas diferencias refuerzan la hipótesis de que el pH ideal de la reacción debe ser cercano pero inferior al pK_a del grupo funcional glicosilable, para permitir su aproximación en forma neutra y su desprotonación dentro del centro activo. De esta manera, un pH bajo permite la formación del éster de xilosa (los ácidos *p*-cumárico y ferúlico presentan un pK_1 de 4,39 y 4,56 respectivamente) mientras que el incremento en la basicidad desplaza la catálisis hacia la glicosilación del grupo hidroxilo (pK_2 de 8,37 y 8,65 para ferúlico y *p*-cumárico respectivamente).

Tabla 9. Resumen de los informes ANOVA para los modelos multiparamétricos correspondientes a la síntesis de cada xilósido.

Modelo ⁽¹⁾	Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	Valor F	Valor p ⁽²⁾
[<i>p</i> -Cumaroil xilósido] _(a)	295,49	20	14,77	8,85	< 0,0001
[<i>p</i> -Cumaroil xilósido] _(b)	1043,99	20	52,20	7,24	< 0,0001
[<i>p</i> -Cumaroil xilósido] _(c)	33,73	20	1,69	28,35	< 0,0001
[Feruloil xilósido] _(a)	127,28	20	6,36	9,96	< 0,0001
[Feruloil xilósido] _(b)	924,34	20	46,22	7,92	< 0,0001
[Feruloil xilósido] _(c)	72,41	20	3,62	31,74	< 0,0001

¹ a: Xilopiranososa unida al carboxilo del aceptor; b: Xilopiranososa unida al hidroxilo del aceptor; c: Xilopiranososa unida al carboxilo y xilopiranososa unida al hidroxilo del aceptor.

² Los valores p menores de 0,05 indican que la ecuación desarrollada para el modelo es significativa.

20

Ejemplo 15. Utilización de rBxTW1-E495A para la producción de glicósidos a partir de otros donadores.

Se ensayó la capacidad del mutante rBxTW1-E495A para transferir unidades de arabinopiranososa y arabinofuranosa en lugar de xilopiranososa. El experimento se planteó en base a la actividad secundaria que presentaba la enzima silvestre frente a los sustratos *p*NPAp y *p*NAf (Nieto-Domínguez et al., 2016). Como aceptor se escogió vanillina al haberse demostrado previamente que el xilósido correspondiente podía ser

25

obtenido eficazmente. Los resultados demostraron la formación tanto del derivado arabinopiranosido como el arabinofuranosido de la vanillina, pero con rendimientos inferiores a los observados para el xilopiranosido.

5 En el caso del derivado arabinofuranosido el producto fue detectado por TLC únicamente tras el tiempo de 16 h de incubación y los niveles de producto observados fueron suficientes para confirmar su masa molecular por ESI-MS, pero, cualitativamente, se consideraron demasiado bajos para una asignación estructural por RMN. El bajo rendimiento se asoció a un muy bajo consumo de *p*NAf (dato no mostrado).

10

El derivado arabinopiranosido se obtuvo a mayores niveles y además de verificar su masa por ESI-MS se identificó su estructura por RMN. La figura 6 muestra el análisis del rendimiento de su producción a lo largo del tiempo. Se observa que incluso incrementando notablemente el tiempo de reacción los niveles de conversión no alcanzan los obtenidos para el xilósido.

15

Ejemplo 16. Utilización de rBGL-2-E446A para la producción de distintos glucósidos.

Para confirmar que enzimas de la familia GH3 con características próximas a las de rBxTW1 muestran un perfil similar de potenciales aceptores se seleccionó la β -glucosidasa rBGL-2, otra glicosidasa procedente de *T. amestolkiae* expresada en *P. pastoris* y con perfiles de pH y temperatura muy parecidos a los de la β -xilosidasa recombinante. Después de obtener el correspondiente mutante tioglicoligasa se ensayó, en las condiciones descritas en el ejemplo 3, utilizando bencenotiol como
20
25
aceptor típico de este tipo de mutantes, pero también frente a EGCG, *N*-hidroxibenzotriazol y 3,5-dibromo-1,2,4-triazol, compuestos cuya glicosilación utilizando una tioglicoligasa solamente se había demostrado en el caso de rBxTW1-E495A.

Los tiempos de reacción se incrementaron a 16 h debido a que, independientemente de la eficacia de la enzima para cada aceptor, el hecho de utilizar como donador *p*NPG en
30
lugar de *p*NPX causa una ralentización de la formación del intermediario enzima-sustrato, al perderse la reactividad adicional que las pentosas aportan en comparación a las hexosas (Laroque et al., 2008; Lievonen et al., 2002).

La mezcla de reacción completa en el caso del bencenotiol y el producto purificado correspondiente al resto de aceptores probados se analizaron por ESI-MS confirmando en todos los casos la masa molecular esperada para el glucósido.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un glicoconjugado, caracterizado por que comprende poner en presencia de una tioglicoligasa de la familia GH3
5
 - una molécula de carbohidrato unida a un buen grupo saliente como donador, y
 - una molécula orgánica con un grupo funcional en su forma neutra como aceptor,a un valor de pH que cumpla
 - pH – pK_a del aceptor ≤ 2, y
 - 10 pK_a del aceptor – pH ≤ 4,5,con la condición de que dicha tioglicoligasa presenta un centro activo, y que dicho aceptor no presente en su estructura una carga positiva o negativa capaz de interactuar con dicho centro activo.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha molécula
15 de carbohidrato es un monosacárido.
3. Un procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que dicho monosacárido es β-D-xilopiranososa, α-L-arabinopiranososa, α-L-arabinofuranosa o β-D-glucopiranososa.
4. Un procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que dicho
20 monosacárido es β-D-xilopiranososa.
5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que dicho grupo saliente está seleccionado entre un fenol, un éster carboxílico, un fosfoéster, una sulfona, un haluro de glicosilo o una azida de glicosilo.
6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por
25 que dicho valor de pH cumple que pH – pK_a del aceptor = 0.
7. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que dicho valor de pH cumple que pK_a del aceptor – pH ≤ 3,5.
8. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que dicha tioglicoligasa de la familia GH3 es una tioglicoligasa de tipo β.
- 30 9. Un procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que dicha tioglicoligasa de tipo β es la tioglucoligasa rBGL-2-E446A identificada por la SEQ. ID. NO:10.
10. Un procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por que dicha tioglucoligasa rBGL-2-E446A está identificada por una secuencia con al menos un
35 70% de identidad con la SEQ. ID. NO:10.

11. Un procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que dicho porcentaje de identidad es al menos del 90%.
12. Un procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que dicha tioglicoligasa de tipo β es la tioxiloligasa rBxTW1-E495A identificada por la SEQ. ID. NO:5.
13. Un procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado por que dicha tioxiloligasa rBxTW1-E495A está identificada por una secuencia con al menos un 70% de identidad con la SEQ. ID. NO:5.
14. Un procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que dicho porcentaje de identidad es al menos del 90%.

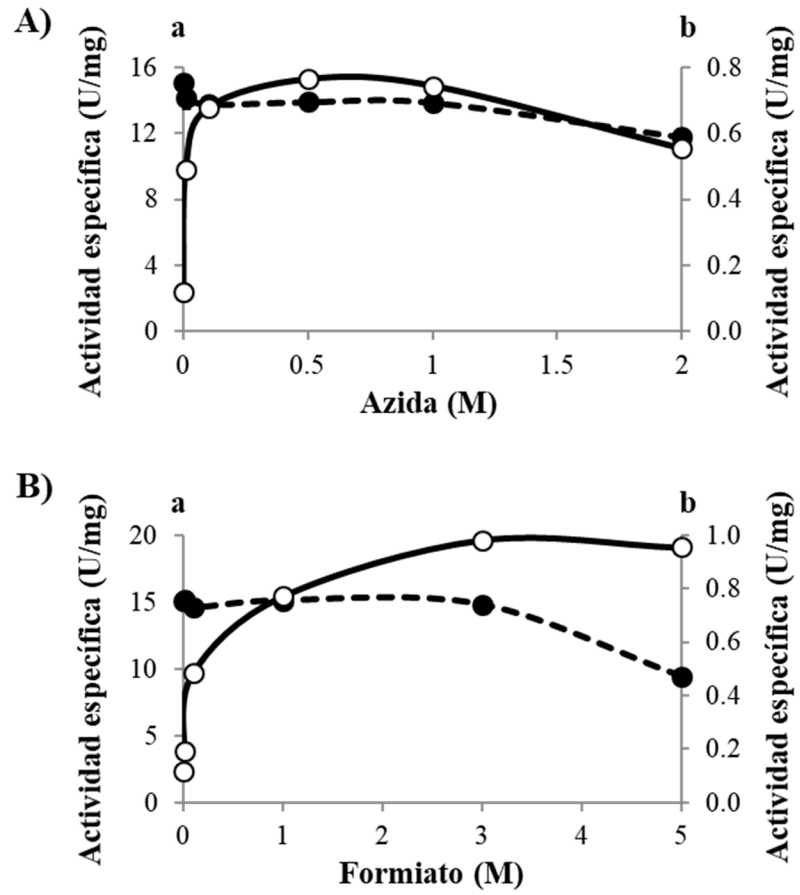


Figura 1

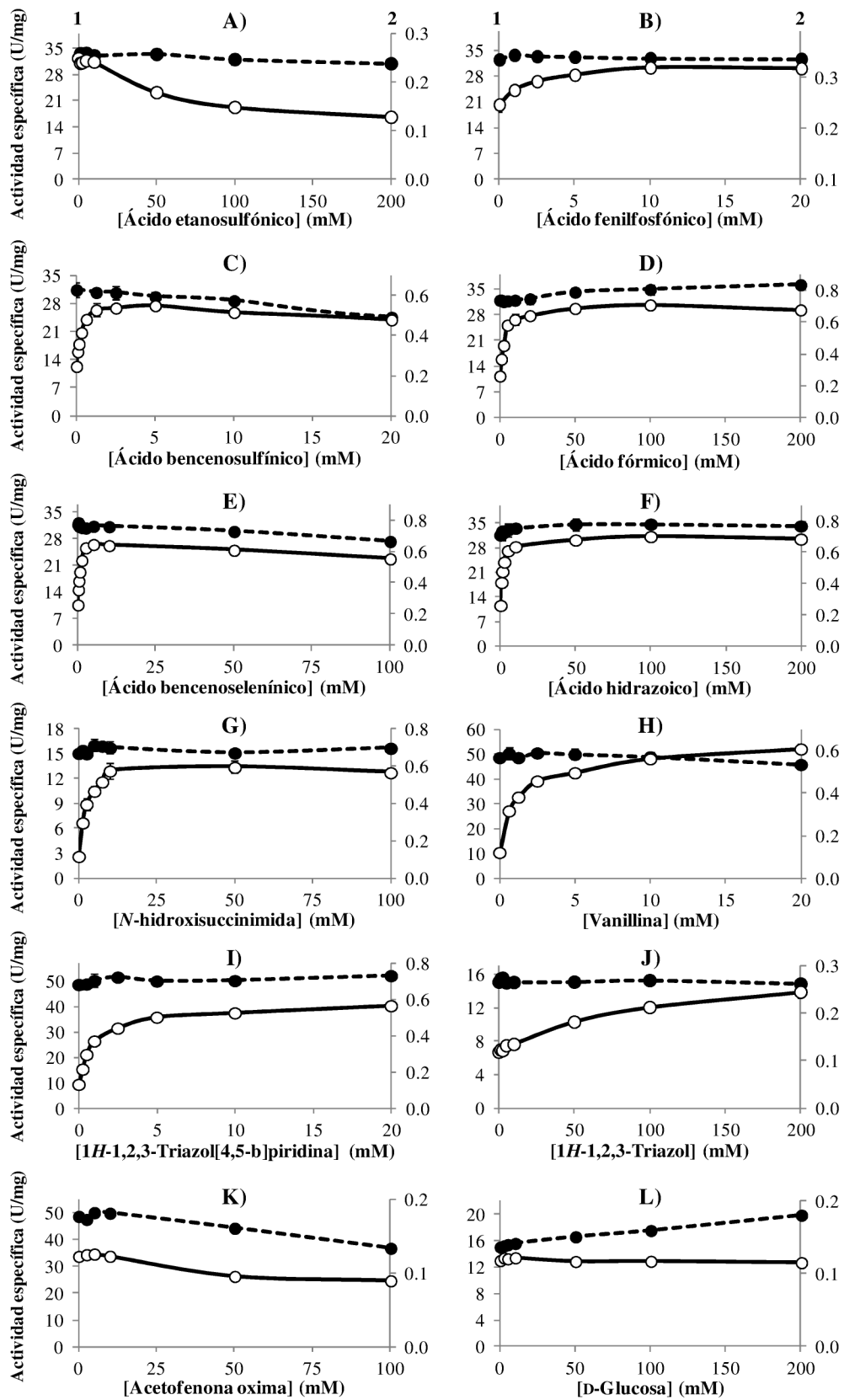


Figura 2

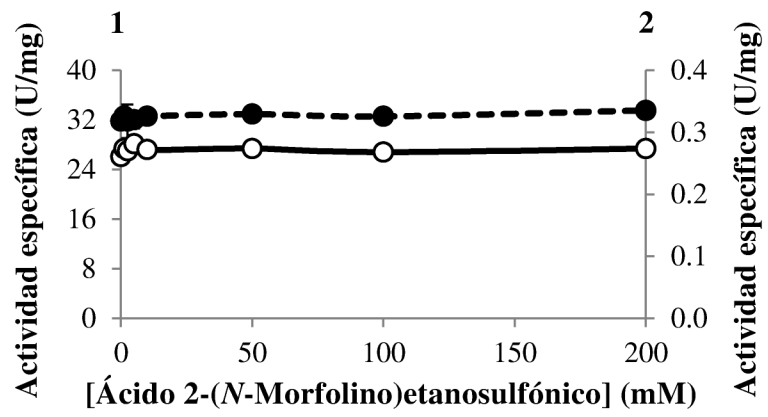


Figura 3

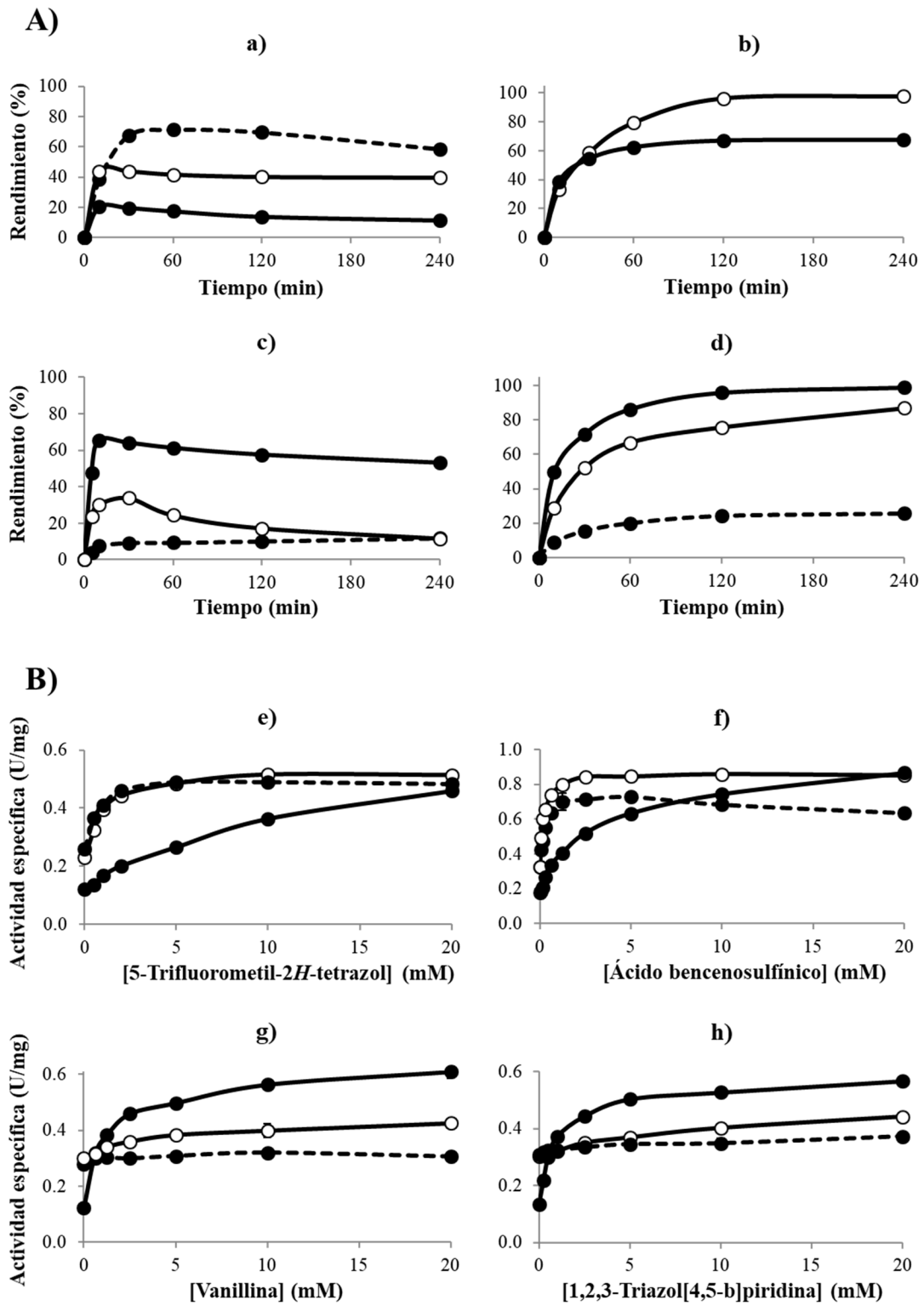


Figura 4

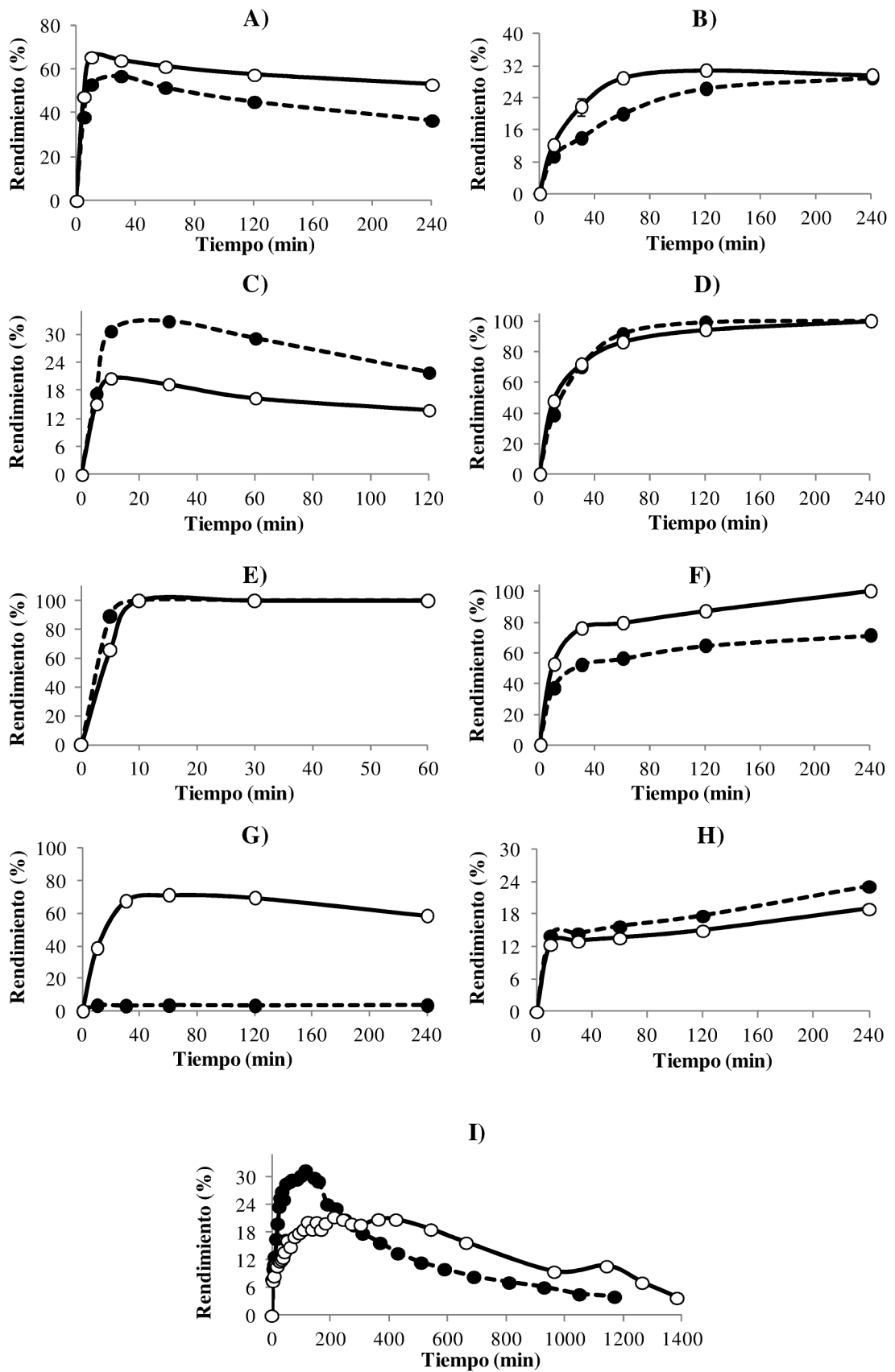


Figura 5

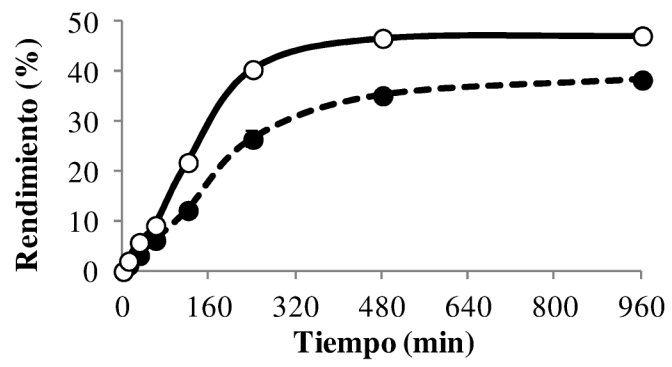


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201930082

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.02.2019

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: **C12P19/44** (2006.01)
C12N9/24 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	NIETO-DOMÍNGUEZ, MANUEL, et al. Enzymatic fine-tuning for 2-(6-hydroxynaphthyl) β -D-xylopyranoside synthesis catalyzed by the recombinant β -xylosidase BxTW1 from <i>Talaromyces amestolkiae</i> . . Microbial cell factories, 2016, Vol. 15, Nº 1, Páginas 171. Página 2-3 y 5-14.	1-8 y 12
A	BOJAROVÁ, PAVLA; KREN, VLADIMIR. . Glycosidases in carbohydrate synthesis: When organic chemistry falls short.. CHIMIA International Journal for Chemistry, 2011, Vol. 65, Nº 1, Páginas 65-70. Página 69.	1-8 y 12
A	MÜLLEGER, JOHANNES, et al. Engineering of a thioglycoligase: randomized mutagenesis of the acid–base residue leads to the identification of improved catalysts. . Protein Engineering Design and Selection, 2005, Vol. 18, Nº 1, Páginas 33-40. Todo el documento.	1-8 y 12
A	NIETO-DOMÍNGUEZ, MANUEL, et al. Novel pH-stable glycoside hydrolase family 3 β -xylosidase from <i>Talaromyces amestolkiae</i> : an enzyme displaying regioselective transxylosylation.. Appl. Environ. Microbiol., , 2015, Vol. 81, Nº 18, Páginas 6380-6392. Todo el documento.	1-8 y 12

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: 1-8 y 12

Fecha de realización del informe
27.06.2019

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201930082

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.02.2019

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12P19/44** (2006.01)
C12N9/24 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	NIETO-DOMÍNGUEZ, MANUEL, et al. Characterization of a novel pH-stable GH3 β -xylosidase from <i>Talaromyces amestolkiae</i> : An enzyme displaying regioselective transxylosylation.. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , 2015, Páginas . p. AEM. 01744-15. Todo el documento.	1-8 y 12
A	MÉNDEZ-LÍTER, JUAN A., et al. A novel, highly efficient β -glucosidase with a cellulose-binding domain: characterization and properties of native and recombinant proteins.. <i>Biotechnology for biofuels</i> , 2017, Vol. 10, N° 1, Páginas 256. Todo el documento.	1-8 y 12

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: 1-8 y 12

Fecha de realización del informe
27.06.2019

Examinador
M. J. García Bueno

Página
2/3

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, BIOSIS, EMBL ALL, STN, INTERNET.