



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 280 588**

51 Int. Cl.:

**D06M 16/00** (2006.01)

**D06M 101/06** (2006.01)

**D06M 15/03** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**C08B 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02777717 .6**

86 Fecha de presentación : **16.10.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1448840**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2004**

54 Título: **Método químico-enzimático para la modificación de materiales de carbohidrato polimérico.**

30 Prioridad: **16.10.2001 SE 0103446**  
**16.10.2001 SE 0103447**  
**23.07.2002 SE 0202310**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.09.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.09.2007**

73 Titular/es: **SWETREE TECHNOLOGIES AB.**  
**Tvistevagen 47**  
**907 19 Umea, SE**

72 Inventor/es: **Teeri, Tuula, T. y**  
**Brumer, Harry**

74 Agente: **Isern Jara, Jaime**

ES 2 280 588 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Método químico-enzimático para la modificación de materiales de carbohidrato polimérico.

**5 Ámbito de la invención**

La presente invención se refiere a un método químico-enzimático para la modificación de materiales de carbohidrato polimérico, en particular a la utilización de un interfaz polimérico activado para introducir grupos químicos específicos sobre la superficie de cualquier material de carbohidrato polimérico con el objeto de alterar las propiedades físico-químicas de dicho material, así como de materiales producidos con este método y productos que comprenden estos materiales.

**Antecedentes y estado de la técnica**

15 Prácticamente todos los materiales de celulosa utilizados en las industrias del papel y del cartón así como en la industria textil son tratados químicamente para alterar las propiedades superficiales de dichos materiales, ya sea antes, (por ejemplo pulpa de madera, hebra de algodón, etc) o después de la transformación del producto en su forma tridimensional final (por ejemplo hojas, cartón ondulado, tejidos, etc). El tratamiento de los materiales de celulosa con aditivos químicos en diversos momentos del proceso de fabricación produce cambios importantes en las propiedades de la superficie de la fibra. Por ejemplo, se añade carboxi metilcelulosa, un derivado aniónico de la celulosa, a las pulpas de la madera para aumentar la retención de los rellenos catiónicos y agentes encolantes habitualmente utilizados.

De forma similar, se añaden encolantes orgánicos como alquil ceteno dímero y anhídrido succínico durante la formación de la hoja de papel para aumentar la hidrofobicidad y hacer que la hoja se pueda imprimir. En la utilización de materiales de celulosa como agentes de envasado para líquidos y alimentos, el papel y el cartón se suelen laminar con un termoplástico, como el polietileno para proporcionar una barrera impermeable a soluciones acuosas. Tanto los textiles como las hojas de papel se tiñen o imprimen de forma rutinaria, lo cual constituye otro ejemplo de modificación de la superficie. Gran parte de la tecnología actual en los papeles para documentos de valor y para el envasado (billetes de banco, documentos y papeles rastreables) se basa en el tratamiento de las superficies con productos químicos específicos que se pueden analizar posteriormente para determinar su autenticidad. Además, los materiales celulósicos presentan un gran potencial en la industria de los polímeros para una amplia gama de aplicaciones, como agentes de relleno, laminados y productos para paneles, compuestos madera - polímero, compuestos poliméricos, aleaciones y mezclas, y derivados de celulosa.

35 No obstante, debido a ciertos cuellos de botella en su fabricación o en el rendimiento, la utilización de dichos compuestos sigue siendo limitada. En los últimos años, hay una mayor demanda de agentes de relleno para superficies modificadas que mejoran las propiedades del polímero virgen y reducen el coste o el peso de los productos terminados. La optimización del enlace interfacial entre la fibra y la matriz del polímero constituye un aspecto importante con respecto al rendimiento mecánico óptimo y a la durabilidad de los compuestos reforzados con fibra. La calidad del interfaz fibra-matriz es importante para la aplicación de fibras naturales como refuerzo de plásticos. Como las fibras y las matrices son químicamente diferentes, se requiere una fuerte adhesión en sus interfaces para que se produzca una transferencia eficaz del esfuerzo y una distribución del enlace por el interfaz. Se necesitan por lo tanto nuevos métodos para la derivación de la celulosa, con el objeto de mejorar la adhesión fibra-matriz para el procesamiento de polímeros, adhesivos y materiales compuestos nuevos.

45 La tecnología actualmente disponible para la modificación de la superficie de la fibra de celulosa por medio de tratamientos químicos y físicos carece de cierto grado de control en la forma en que se introducen los agentes sobre la superficie de la fibra. Un inconveniente particularmente importante que presenta la modificación química directa de la célula es que la mayoría de los productos químicos penetran en la estructura de la fibra y las modificaciones químicas que se producen en el interior de las fibras conducen a la pérdida de la estructura y de las propiedades de la fibra. Como catalizadores, las enzimas son altamente específicas en su forma de actuar y ofrecen por lo tanto una alternativa atractiva a los métodos tradicionales. Además, la naturaleza proteínica de estos catalizadores significa que son fácilmente degradables y no nocivos para el medio ambiente. Además, las enzimas actúan de forma natural en la superficie eliminando por lo tanto el problema de penetración en la estructura de la fibra.

55 Las enzimas de degradación que catalizan la descomposición de sus sustratos por la segmentación de los enlaces químicos son objeto de gran atención en los últimos 15 años para el tratamiento de materiales de celulosa, principalmente en la industria de la pulpa y del papel. Por ejemplo, se utilizan ligninasas para mejorar la blanqueabilidad y el brillo de las pulpas eliminando la lignina, mientras que el tratamiento con xilanasas facilita la eliminación de la lignina re-precipitada durante el proceso de cocción. De forma similar, se utilizan celulasas en gran medida en la industria textil para conseguir el acabado de las prendas. Por ejemplo el tratamiento con celulasa de la mezcilla ha sustituido en gran medida el tambor mecánico con piedra pómez para crear el efecto denominado de "apomazado". Las celulasas son también un ingrediente clave en cierto número de detergentes de lavandería donde actúan como agentes de desempilamiento (depilling agents) recortando enzimáticamente las fibras de algodón deshilachadas.

65 Pese a la amplia utilización de enzimas de degradación en la modificación de las fibras de celulosa, la utilización de enzimas que trabajen en la dirección opuesta, es decir la dirección sintética, está poco desarrollada. Esto es debido

en gran parte a que se conoce relativamente poco de las enzimas responsables de la síntesis de polisacáridos como la celulosa y la hemicelulosa. La mayoría de estas enzimas conocidas como transferasas nucleótido azúcar - dependientes están unidas a la membrana celular, lo cual dificulta su aislamiento y caracterización. Además, la preparación de los azúcares activados resulta cara. La utilización de transferasas nucleótido dependientes de azúcar en la modificación de la fibra celulósica queda limitada además por el hecho de que no se tolera la modificación química del anillo del azúcar de los sustratos naturales que se incorporan al final en la cadena creciente de polisacáridos. Aparte de las transferasas, se pueden utilizar también glicosil hidrolasas que utilizan un mecanismo de reacción de retención como ciertas  $\beta$ -glucosidasas o celulasas, para la síntesis de carbohidrato si se excluye el agua de la mezcla de reacción. Cuando se encuentran en disolventes orgánicos, estas enzimas catalizan las reacciones de transglicosilación que conducen a la formación en lugar de a la degradación de enlaces glicosílicos.

No obstante, la necesidad de utilizar disolventes orgánicos constituye un inconveniente notable de este método. Además, la retención de glicosidasas se puede diseñar para eliminar su nucleófilo catalítico. Este tipo de enzima no puede formar un intermedio enzima - sustrato covalente necesario para la hidrólisis aunque puede catalizar la condensación de azúcares aceptores y donadores adecuados juntos, si el azúcar donador se fluora para mimetizar el estado de transición de la reacción. Al igual que ocurre con las glicosil transferasas dependientes de nucleótido, el inconveniente es la necesidad de sustratos activados que limitarán la utilización de la tecnología en aplicaciones a gran escala.

Por consiguiente, es preciso desarrollar procesos para la introducción de una amplia gama de productos químicos con funcionalidades diferentes en materiales carbohidratos polímeros y en particular en fibras de celulosa, sin comprometer el carácter intacto de la estructura de la fibra. En el caso ideal, el proceso incorporará una o más enzimas, desprovistas de actividad hidrolítica u otra actividad degradante, ya que esto se opondría a todo intento de agregar grupos químicos a las fibras.

El documento EP 562 832 describe una codificación génica para una endo-xiloglucan transferasa y sugiere que se utilice ese gen para regular la morfología de una planta. La descripción también menciona un método de transferencias de moléculas de xiloglucano que supone dividir una unión en una molécula de xiloglucano utilizando una endoglucan transferasa y unir el extremo reductor resultante de segmento molecular de xiloglucano a D-glucosa del extremo no reductor de otra molécula de xiloglucano. Repitiendo este proceso cierto número de veces, se pueden construir moléculas de xiloglucano de estructura arbitraria que, según se dice, se pueden aplicar a la síntesis de polisacáridos híbridos.

El documento US 5.968.813 (una continuación de PCT/DK9600538, publicado como WO 97/23683) describe un proceso para mejorar las propiedades de resistencia de los materiales de celulosa, según el cual se pone en contacto un material de celulosa con una xiloglucan endo trans glicosilasa (XET) en un medio acuoso. El tratamiento por XET aumenta al parecer la reticulación entre las fibras de celulosa, mejorando por lo tanto la resistencia y/o la estabilidad de forma del material de celulosa.

### Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un método para modificar un material de carbohidrato polimérico (PCM), método que comprende una etapa de unión de un grupo químico que tiene una funcionalidad deseada a dicho material de carbohidrato mediante una molécula ligante de carbohidrato que lleva el grupo químico y comprende un polímero de carbohidrato soluble (SCP) que comprende una hemicelulosa, siendo capaz dicha molécula ligante de unirse al PCM.

En una realización, el método comprende las etapas de aportar un fragmento de polímero de carbohidrato (CPF) que comprende un grupo químico que tiene una funcionalidad deseada, que podría ser habitualmente hidrófobo, cargado, reactivo. El CPF se pone en contacto con un polímero de carbohidrato soluble (SCP) en condiciones que conducen a la formación de un complejo entre el CPF y por lo menos una parte del SCP. El PCM es finalmente modificado al dejar que el SCP se una con el PCM.

La presente invención se refiere además a materiales y composiciones creadas por el método y a materiales y composiciones que comprenden el complejo del PCM y un SCP que comprende un grupo químico que tiene una funcionalidad deseada.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para modificar un material de carbohidrato polimérico (PCM), método que comprende una etapa de fijación de un grupo químico que tiene una funcionalidad deseada a dicho material de carbohidrato por medio de una molécula ligante de carbohidrato que comprende el grupo químico y comprende un polímero de carbohidrato soluble (SCP), que comprende una hemicelulosa, siendo capaz dicha molécula ligante de carbohidrato de unirse al PCM.

Una realización de este método se ilustra en la figura 1, que muestra el PCM (1) no modificado, y la molécula ligante de carbohidrato (CLM) (2), comprendiendo dicha CLM (2) por lo menos una parte de un SCP (3) y un grupo químico (5) y opcionalmente completado con un fragmento de polímero de carbohidrato (CPF) (4) que comprende el grupo químico. Como la molécula ligante de carbohidrato puede fijarse al PCM, la unión se producirá cuando se ponga en contacto el PCM.

## ES 2 280 588 T3

En otra realización de la invención, el método comprende las etapas de

(i) proporcionar un fragmento polímero de carbohidrato (CPF) que comprende un grupo químico que tiene una funcionalidad deseada,

(ii) poner en contacto dicho CPF que comprende el grupo químico con un carbohidrato polimérico soluble (SCP) en condiciones que conducen a la formación de un complejo constituido por dicho CPF que comprende el grupo químico y el SCP, formando el CPF y SCP juntos la molécula ligante de carbohidrato (CLM), y

(iii) poner en contacto dicha CLM con el PCM que se va a modificar en condiciones en las que la CLM se une al PCM para obtener el material de carbohidrato polimérico modificado.

El término “materiales de carbohidrato polimérico” abreviado “PCM” se refiere a un material que comprende un material de carbohidrato polimérico insoluble en agua y/o material de carbohidrato polimérico soluble en agua. El PCM puede ser cualquier material, constituido total o parcialmente por unidades repetidas de uno o más monosacáridos. Estos PCM suelen ser compuestos de dos o más tipos diferentes de carbohidratos poliméricos o un polímero de carbohidrato y otros polímeros como proteína. El PCM puede comprender una quitina, que es un polímero de N-acetil glucosamina, que suele formar complejos con proteínas u otros polisacáridos como manano.

El PCM puede comprender también celulosa. La celulosa puede ser un homopolímero de unidades de glucosas  $\beta$ -1,4-ligadas. Los largos homopolímeros de glucosa (por ejemplo 8-15000 unidades de glucosa) se amontonan unos sobre otros por medio de enlaces de hidrógeno, formando de este modo un material insoluble. Estos materiales de celulosa pueden ser completamente cristalinos o pueden presentarse en forma desordenada, amorfa o pueden ser una mezcla de ambos. Pueden producirse también solubilizando en primer lugar el material de celulosa insoluble, regenerándolo luego para formar material de celulosa insoluble con una organización de cadena diferente (celulosa II).

La celulosa en las paredes celulares de la planta forma complejos con otros polisacáridos solubles de la pared celular como las hemicelulosas y la pectina. Como ejemplos de PCM que comprenden celulosa y/o compuestos de celulosa / hemicelulosa se pueden citar las fibras de celulosa, microfibrilas de celulosa (fibras cerámicas), papel y productos de pulpa y materiales de celulosa.

Como se podrá apreciar en la descripción y en los ejemplos, el término PCM se refiere a cualquier estructura en pequeños polímeros (por ejemplo dimensiones inferiores a 1 nm), grandes polímeros (por ejemplo dimensiones comprendidas entre 0,1 - 1000 nm), agregados de polímeros (dimensiones de 1 a 10000 nm), fibras (por ejemplo dimensiones 0,1 a 100.000  $\mu$ m), agregados de fibras, por ejemplo dimensiones de 0,00001 a 1000 m).

El término “fibra celulósica” se refiere a una célula vegetal constituida por una pared celular primaria exterior, que encapsula una pared celular secundaria más gruesa y más compleja. El componente esencial de la fibra es la celulosa, que es el componente que lleva la carga de las paredes celulares de la planta. Según las diferentes secuencias de pulpa, las fibras de pulpa pueden contener o no material de pared celular primaria. El término “microfibrilas de celulosa” se refiere a las unidades elementales de cristales de celulosa producidos por plantas u otros organismos. Las microfibrilas de celulosa se pueden preparar a partir de fibras celulósicas vegetales o más fácilmente a partir de cultivos de bacterias sintetizadoras de celulosa tales como *Acetobacter xylinum spp.*

En el contexto de la presente invención, las fibras de celulosa se pueden extraer de una planta anual como por ejemplo lino, cáñamo o cereales o de una planta perenne como por ejemplo algodón, álamo, abedul, sauce, eucalipto, alerce, pino, picea. Las microfibrilas de celulosa se pueden obtener a partir de cultivos bacterianos de por ejemplo *Acetobacter xylinum spp.* Un papel o producto de pulpa puede ser cualquier material que contiene celulosa, conocido en el estado de la técnica. Se trata, sin que esto suponga limitación, de materiales como madera o fibras de pulpa, diferentes pulpas químicas, pulpas mecánicas y termomecánicas, pulpas apomazadas, papeles de filtro, papeles finos, papel continuo, materiales de celulosa regenerada, cartón para contracolado, tejido y otros productos higiénicos, papel para sacos y papel kraft, otros materiales de embalaje, cartones de partículas y de fibras, así como superficies de productos sólidos de madera o compuestos de madera y fibra.

Otros ejemplos de PCM son los materiales de carbohidrato polimérico utilizados en aplicaciones médicas, como membranas, geles, perlas utilizadas en diagnóstico o tecnología de separación y membranas utilizadas en aplicaciones electrónicas. El producto de fibra, dentro del contexto de la presente invención, puede ser también un nuevo tipo de compuesto con otros polímeros o materiales naturales o sintéticos así como compuestos electrónicos.

Dentro del contexto de la presente invención, una tela de celulosa es cualquier tela que contiene celulosa, conocida en el estado de la técnica como algodón, viscosa, cupro, fibras de acetato y de triacetato, modal, rayón, fibras de ramio, lino, Tencel®, etc o mezclas de lo anterior o mezclas de cualquiera de estas fibras o mezclas de cualquiera de estas fibras, junto con fibras sintéticas o lana, como mezclas de algodón y spandex (stretch-denim), Tencel® y lana, viscosa y poliéster, algodón y poliéster, algodón y lana.

El término “polímeros de carbohidrato solubles” abreviado (SCP) se refiere a polímeros que comprenden uno o más monosacáridos diferentes o sus derivados, que pueden estar disueltos en disolventes acuosos u orgánicos. Como

ejemplos se pueden citar los polisacáridos clasificados como hemicelulosas (aquellos polímeros de carbohidrato no compuestos únicamente por unidades de glucosa  $\beta$  (1-4)-ligadas, es decir celulosas), pectinas (ácidos poliurónicos y ésteres), y almidones (poliglucosa  $\alpha$  (1-4)-ligada) con o sin ramificación de cadena lateral  $\alpha$  (1-6). El xiloglucano, que es un polisacárido compuesto por un soporte principal de poliglucosa  $\beta$  (1-4)-ligada decorada con residuos de  $\alpha$  (1-6)-xilosa, que a su vez pueden ser sustituidos por otros sacáridos como mucosa y arabinosa, es un ejemplo de estos SCP, específicamente una hemicelulosa. En una realización preferida, el SCP es capaz de unirse al PCM, por ejemplo a través de uno o más enlaces de hidrógeno, interacción iónica, uno o más enlaces covalentes, fuerzas de van der Waals o cualquier combinación de lo anterior. En una realización de la presente invención, el SCP puede ser un CPF según la descripción dada a continuación.

El término “fragmentos de polímero carbohidrato” abreviado “CPF” se refiere a moléculas que pueden ser fragmentos enzimática o químicamente preparados de los SCP. Como ejemplos de estos fragmentos, se pueden citar cualquier número de las unidades de repetición de dichos SCP. Los fragmentos adecuados pueden contener por lo tanto de dos a aproximadamente 5.000 unidades de monosacáridos en el soporte principal polímero, por ejemplo 2-10, 4-10, 3-100, 11-15, 20-25, 26-40, 41-60, 61-100, 101-200, 201-300, 301-400, 401-500, 501-1000, 1001-2000, 2001-3000, 3001-4000 ó 4001-5000 unidades de monosacáridos. El CPF puede comprender además cadenas laterales de longitud y composición diferente. Como ejemplos específicos, se puede citar, sin que esto suponga limitación, los xiloglucos - oligosacáridos (XGO) como los de la estructura descrita en la figura 4 o un fragmento de los mismos, o modificado con uno o más residuos de fucosilo u otros monosacáridos.

Los XGO suelen recibir el nombre indicado en el sistema de nomenclatura expuesto en Fry *et al.*, (1993) *Physiologie Plantarum*, 89, 1-3 donde G representa un residuo beta - glucopiranosil no sustituido, X representa una unidad de xilopiranosil-alfa (1-6) - glucopiranosil, L representa una unidad de galactopiranosil - beta (1-2)-xilo piranosil-alfa (1-6)-glucosil, F representa una unidad de fucopiranosil - alfa (1-2) - galactopiranosil - beta (1-2) - xilo piranosil-alfa (1-6) glucosil, entre otros. Estas diversas unidades pueden estar conectadas por un ligante beta (1-4) entre las unidades de glucopiranosil para formar un soporte principal de beta (1-4) - glucan polisacárido. Utilizando la nomenclatura, los XGO que se suelen aislar después de la digestión por endoglucanosa de tamarindo xiloglucano, son XXXG, XLXG, XXLG y XLLG (véase figura 4). Si la glucosa final reductora (G) de estos oligosacáridos está en forma de alditol reducido, esta unidad se representa por “Gol”. Por lo tanto, por ejemplo, los derivados reducidos (alditol) de los oligosacáridos antes citados de tamarindo xiloglucano se designan XXXGol, XLXGol, XXLGol y XLLGol.

En el contexto de la presente invención, el término “grupo químico” se refiere a cualquier grupo radical químico (R-) de interés potencial para la activación o la modificación de las superficies de carbohidrato polimérico insoluble. La activación de las superficies de carbohidrato polimérico insoluble se define como una modificación que permitirá realizar ulteriores reacciones químicas o enzimáticas, mientras que la modificación de las superficies se define como un tratamiento que, como tal, es suficiente para alterar las propiedades funcionales.

Como ejemplo de grupos químicos adecuados para dicha activación o modificación se pueden citar los grupos iónicos (catiónicos, por ejemplo grupos amino cuaternarios, grupos amonio, carbocationes, grupos de sulfonio o cationes metálicos etc; aniónicos, por ejemplo alcóxidos, tiolatos, fosfonatos, carbaniones, carboxilatos, boronatos, sulfonatos, sales Bunte, etc; o zwitterionicos (de carga positiva y negativa), por ejemplo aminoácidos, nidos u otras combinaciones de grupos aniónicos y catiónicos en la misma molécula o sus ácidos o bases conjugados no ionizados (según convenga), grupos hidrófobos (alquilo hidrocarburos, por ejemplo grupos acilo o alquilo grasos y derivados no saturados, o perfluor-alcanes; o aril hidrocarburos, por ejemplo hidrocarburos aromáticos o policíclicos o heterociclos), grupos hidrófilos no cargados (por ejemplo poliéteres, tales como polietilenglicol), grupo potencialmente reactivos como los que contienen átomos electrofílicos (por ejemplo compuestos carbonilo, carbocationes, haluros de alquilo, acetales, etc.) nucleófilos (por ejemplo nitrógeno, azufre, oxígeno, carbaniones, etc) o monómeros para reacciones de polimerización (radical libre por ejemplo acrilamida, bromobutirato, vinilo, estireno, etc; o también por ejemplo reactivos nucleofílicos o electrofílicos), grupos cromofóricos o fluorofóricos (pigmentos, tintes o blanqueadores ópticos, por ejemplo tintes C.I., fluoresceína, sulforhodamina, pireno), biotina, isótopos reactivos, precursores de radicales libres y mitades de radicales libres estables (por ejemplo TEMPO), secuencias de ácidos nucleicos, secuencias de aminoácidos, proteínas o agentes ligantes de proteína (por ejemplo ligandos por afinidad, biotina, avidina estreptavidina, carbohidratos, anticuerpos o sustratos de enzima o sus análogos), receptores, hormonas, vitaminas y fármacos.

El término “moléculas ligantes de carbohidrato”, abreviado “CLM”, se refiere a una molécula o complejo que contiene por lo menos una parte de un SCP según la descripción anterior y un grupo químico. En una realización preferida, la CLM es capaz de fijarse al PCM, por ejemplo a través de uno o más enlaces de hidrógeno, interacción fónica, uno o más enlaces covalentes, fuerzas de van der Waals o cualquier combinación de los anteriores.

Los ejemplos 9, 13, 15, 16, 181 y 30 muestran la aplicación de un grupo químico, sulforhodamina que es cromofórica, fluorofórica e fónica de carga positiva y negativa (ver anterior), para modificar los materiales celulósicos. Los grupos cromofóricos se conocen generalmente como pigmentos; los fluoróforos se utilizan como blanqueadores ópticos en aplicaciones textiles y otras. Y los compuestos iónicos actúan como ayudantes de retención en la fabricación del papel. Los ejemplos 10, 14, 17, 18b y 21 muestran la modificación de la fibra celulósica con fluoresceína, que es asimismo cromofórica, fluorofórica y aniónica en una amplia gama de pH, y por consiguiente tendrá aplicaciones en las que sean deseables estos grupos. Los ejemplos 8, 19 y 20 presentan métodos para la incorporación de un grupo amino en la superficie de la fibra, que es catiónico en una amplia gama de pH y por consiguiente resulta adecuado como agente cambiador de iones y puede aumentar también la retención en la fabricación del papel.

## ES 2 280 588 T3

Además, el grupo amino es intrínsecamente más reactivo que los grupos químicos ya presentes en fibras celulósicas y se puede utilizar por lo tanto para el acoplamiento de una amplia gama de otros productos químicos a la superficie de la fibra. La incorporación de radiactividad se demuestra en el ejemplo 11 y en el ensayo de enzima XET descrito en la parte "a" con este encabezamiento. La radiactividad se puede utilizar para aplicaciones de rastreo y estudios de morfología de la fibra. En los ejemplos 22, 24 y 25 se describen reacciones a cadenas alquilo incorporadas. En particular, los ejemplos 24 y 25 muestran como el anhídrido alquenoil succínico, un agente hidrofobizante común del papel, se puede acoplar específicamente con la superficie de la fibra, incrementando potencialmente la retención de este grupo.

Los ejemplos 23 y 26 demuestran que los grupos aromáticos no-fluorofóricos se pueden acoplar con la fibra; el último ejemplo incorpora un grupo cinnamilo que puede experimentar reacciones de polimerización como las que producen poliestireno y lignina. Asimismo, el bromo isobutilo ligado como se describe en el ejemplo 27 es otro iniciador para reacciones de polimerización de radical libre, tal como se describe en el ejemplo 31, estos grupos se pueden utilizar para producir copolímeros de injerto a base de celulosa que tienen interfaces fibra - matriz de gran calidad con adhesión mutua muy fuerte y muy poco o ningún efecto nocivo de la estructura fibra / celulosa. La incorporación de biotina en el ejemplo 28 permite el acoplamiento directo de conjugados de proteína avidina a la superficie de la fibra de amplio espectro y que se puede utilizar para introducir actividad enzimática y de fijación de proteína a la fibra.

La adición de un grupo tiol (o sulfhidrilo) permite un acoplamiento altamente específico y, lo que es lo más importante, reversible de otros tioles mediante la formación del enlace disulfuro, tal como se describe en los ejemplos 29 y 30. Un amplio conjunto de grupos químicos se puede introducir específicamente con este procedimiento y eliminar posteriormente cuando ya no se desee. Finalmente, todos los ejemplos mencionados anteriormente demuestran que se puede utilizar una amplia variedad de grupos químicos amina - reactivos para incorporar otras funcionalidades, inclusive, sin que esto suponga limitación, cloruros de sulfonilo, isotio cianatos, isocianatos, anhídridos ácidos, compuestos carboxilos activados (incluso los producidos *in situ*) y tioésteres. Muchos de estos productos químicos se pueden utilizar para realizar reacciones que potencien por ejemplo el enlace fibra - fibra o la reactividad de la celulosa con otros materiales.

La CLM se puede preparar por síntesis orgánica o química y/o utilizando la actividad catalítica de ciertas enzimas. En la figura 2 se ilustra una realización de preparación de CLM utilizando una enzima y CPF. El SCP (8) se pone en contacto con una enzima (7) y CPF (4) que comprende un grupo químico (5). En esta realización, la enzima (7) segmenta el SCP e incorpora en su lugar CPF con el grupo químico, obteniéndose como resultado el producto CLM (2). La CLM puede comprender uno o más grupos químicos.

En una realización de la presente invención, la CLM se puede preparar utilizando una enzima capaz de transferir mono- u oligosacáridos nativos o químicamente modificados a los extremos de oligo- o polisacáridos. Estas enzimas incluyen enzimas aunque no se limitan a ello, tienen una elevada actividad de transglicosilación pero una actividad hidrolítica reducida, glucosil hidrolasas con elevada actividad de transglicosilación inherente, enzimas que han sido diseñadas biotécnicamente para potenciar su actividad de transglicosilación y glicosil transferasas que utilizan como sustratos azúcares nucleótidos.

En una realización de la presente invención, la enzima se puede definir como cualquier enzima que, cuando se ensaya con un sustrato donador de glicosilo adecuado (por ejemplo xiloglucano) en presencia y ausencia de un sustrato aceptor de mono-, oligo- o polisacárido (por ejemplo XGO) en condiciones adecuadas para mantener la actividad enzimática, presenta una tasa de incorporación del sustrato aceptor en el sustrato donador que es por lo menos igual al 10% de la tasa hidrolítica, como por lo menos 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, como por lo menos 1000% de la tasa hidrolítica. El ensayo utilizado para determinar las tasas de incorporación del sustrato aceptor en el sustrato donador puede ser el ensayo Radiométrico y/o el ensayo colorimétrico para la determinación de la actividad enzimática, que se describen aquí.

Como ejemplos representativos de enzimas con actividad natural altamente transglicosilante se pueden citar, sin que esto suponga limitación, las amilosas (Skov *et al.*, 2001, J. Biol Chem, 276:25273-8) y ciclo dextrina glicosil transferasa (Van der Veen *et al* 2000. Biochem Biophys Acta. 1543:336-360). Muchas glicosil hidrolasas que operan mediante un mecanismo de retención tienen actividad de glicosilación, que se puede potenciar utilizando disolventes orgánicos. Como ejemplos de estas hidrolasas se pueden citar algunas celulasas y manenadas (Kwon *et al.*, 2002 Biosci Biotechnol Biochem, 66:110-6; Harjunpaa *et al.* 1999, FEBS Lett. 443:149-53), xilanasas (Christakopoulos *et al* 1996, Carbohydr Res. 289:91-104) y quitinasas (Sasaki *et al* 2002, J. Biochem (Tokio). 131:557-64). Como ejemplos de enzimas que han sido diseñadas genéticamente para aumentar la actividad de transglicosilación se pueden citar las glicosintasas basadas en glicosil hidrolasas de retención (Meyer *et al.* 2001. Chem. Biol. 8:437-43; Fainweather *et al* 2002. 3:866-73). Unos ejemplos de estos tipos de enzimas se utilizan para sintetizar oligosacáridos de diseño para fines académicos, industriales y potencialmente terapéuticos.

De preferencia, se elige una enzima que tiene una elevada actividad de transglicosilación y todavía mejor también, a todos los efectos prácticos, una actividad hidrolítica u otra actividad de degradación baja o no detectable. De preferencia, no se necesita ningún azúcar nucleótido o disolvente orgánico para promover la actividad de transglicosilación. Un ejemplo de estas enzimas de transglicosilación es la xiloglucano endo transglicosilasa, una enzima conocida procedente de plantas.

## ES 2 280 588 T3

Por ejemplo, Stephen C. Fry *et al* sugiere en Biochem. J. 15 (1992) 282, páginas 821-828, que XET es responsable de cortar y volver a unir cadenas de xiloglucano intermicrofibrilares y que XET causa por consiguiente la pérdida de pared necesaria para la expansión celular de la planta. Se cree que XET se encuentra presente en todas las plantas, en particular en las plantas terrestres. XET se ha extraído de dicotiledóneas, monocotiledóneas, en particular de monocotiledóneas gramináceas y monocotiledóneas liliáceas y también de musgo y una hepática. XET se puede obtener a partir de una planta tal como se describe en el ejemplo 1 (coliflor) y en el ejemplo 5 (cultivo de suspensión celular de álamo híbrida) o se puede obtener en la forma descrita en Fry *et al.* (más arriba).

Alternativamente, la enzima de transglicosilación se produce por cultivo aeróbico de un organismo anfitrión transformado con la información genética que codifica la enzima de transglicosilación. El organismo anfitrión puede ser una planta, en particular tabaco, maíz o álamo híbrido, hongos, en particular levaduras, tales como *Pichia pastoris* o *Saccharomyces cerevisiae*, hongos filamentosos como *Trichoderma reesei* o *Aspergilli*, que contienen la información genética adecuada necesaria para la expresión proteínica heteróloga en el anfitrión en cuestión. Dichos transformantes se pueden preparar y cultivar con métodos conocidos en el estado de la técnica.

Genes: el gen que codifica la enzima de transglicosilación se puede obtener de la naturaleza, de un organismo que expresa una enzima adecuada de transglicosilación, por ejemplo una planta o un microorganismo. El gen también se puede construir por ingeniería genética, tomando como base los conocimientos disponibles de las enzimas que aparecen en la naturaleza y, modificarse por delección, sustitución o adición de información de secuencia, como regiones de codificación y promotores.

El gen de XET por ejemplo se puede obtener de la coliflor (ejemplo 3) de álamo híbrido (ejemplo 4) o tal como se describe en el documento EP 562 836.

Células anfitrionas: Las células anfitrionas que comprenden el constructo ADN resultante se pueden obtener utilizando métodos conocidos por toda persona experta en la materia.

La célula anfitrión es de preferencia una célula eucariótica, en particular una célula vegetal como un tejido de cultivo o suspensión celular de álamo blanco o tabaco o las hojas o semillas de dichas plantas y de plantas similares. Las células vegetales se pueden transformar por transferencia génica mediada por *Agro bacterium* o utilizando un anión de partículas en la forma ya conocida. La célula anfitrión puede ser también levadura o célula micótica filamentosas o un gel bacteriano. En particular, la célula puede pertenecer a una especie de *Trichoderma*, de preferencia *Trichoderma harzianum* o *Trichoderma reesei* o una especie de *Aspergillus* de preferencia *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*. Las células micóticas se pueden transformar con un proceso que comprende la formación de protoplasto y la transformación de los protoplastos seguido de regeneración de la pared celular en la forma ya conocida.

La utilización de *Aspergillus* como microorganismo anfitrión se ha descrito entre otros en el documento EP 238 023 (Novo Nordisk A/S), y la utilización de trichodermas se ha descrito, entre otros en el documento EP0244234 A2 04-11-1987 [1987/45] EP0244234 A3 12-10-1988 [1988/41, EP0244234 B1 21-07-1993 [1993/29], EP0244234 B2 07-11-2001 [2001/45]; se incorpora aquí, a modo de referencia, el contenido de lo anterior. La célula anfitrión puede ser también una célula de levadura, por ejemplo una cepa de *Saccharomyces* en particular *Saccharomyces cerevisiae* o una cepa de *Pichia sp* como la *Pichia pastoris* o *Kluyveromyces sp*, tal como *Kluyveromyces lactis*. El anfitrión puede ser también una bacteria como por ejemplo la bacteria gram positivo *Bacillus subtilis*, o bacteria gram negativo como *E. coli*. La transformación de la bacteria se puede realizar por ejemplo por transformación de protoplasto o utilizando células competentes en la forma ya conocida.

Según la invención, se puede obtener una enzima de transglicosilación de una dicotiledónea o monocotiledónea, en particular de una dicotiledónea elegida dentro del grupo formado por las siguientes familias de plantas: coliflor, semilla de soja, tomate, patata, colza, girasol, algodón, tabaco y álamo blanco o una monocotiledónea elegida dentro del grupo formado por trigo, arroz, maíz, y caña de azúcar. Como ejemplo de estas enzimas se puede citar cualquier enzima codificada por una de las secuencias SEQ ID NO: 1, 2, 3 o por un homólogo funcional de la misma. Se entiende aquí por homólogo funcional una secuencia que presenta homología con una enzima codificada por una de las secuencias SEQ ID NO: 1, 2, 3 y dicha homología es por lo menos de 50% - por lo menos 60%, 70%, 80%, 90%, 99% o 100%.

El homólogo funcional puede ser alternativamente una enzima codificada a partir de secuencia de ácido nucleico, donde dicha secuencia de ácido nucleico tiene una homología con por lo menos una de las secuencias en SEQ ID NO: 1, 2, 3 de por lo menos 50% por lo menos 60%, 70%, 80%, 90%, 99% ó 100%.

En el presente contexto, el término "homología" indica una medida cuantitativa del grado de homología entre dos secuencias de aminoácidos de igual longitud o entre dos secuencias de nucleótidos  $\frac{(N_{ref} \cdot N_{dif})/(\pi)}{N_{ref}}$  de igual longitud.

Si las dos secuencias que se van a comparar no tienen la misma longitud, deberán alinearse para encajarse lo mejor posible. La identidad de secuencias se puede calcular con  $N_{dif}$  igual al número total de residuos no idénticos en las dos secuencias alineadas, y  $N_{ref}$  es el número de residuos en una de las secuencias. Por lo tanto, la secuencia AGTCAGTC tendrá una identidad de secuencia del 75% con la secuencia AATCAATC ( $N_{dif} = 2$  y  $N_{ref} = 8$ ). Todo

## ES 2 280 588 T3

hueco se recuenta como no identidad del o de los residuos específicos, es decir la secuencia ADN AGTGTC tendrá una identidad de secuencia de 75% con la secuencia de ADN AGTCAGTC (Ndif=2 y Nref=8). La identidad de secuencia se puede calcular alternativamente con el programa BLAST, por ejemplo el programa BLASTP (Pearson & Lipman (1988) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/bin/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bin/BLAST)) en un aspecto de la invención, la alineación se realiza con el algoritmo de alineación global con parámetros de defecto según describe Huang & Miller (1991), disponible en <http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN.for.htm>.

Alternativamente, la enzima puede ser una enzima que muestre una homología de frecuencia inferior aunque dicha secuencia ha sido diseñada para tener una actividad de transglicosilación.

Los presentes inventores basan la invención, entre otras cosas, en el hecho de que el xiloglucano, naturalmente presente en las paredes celulares primarias de fibras vegetales, puede establecer fuertes enlaces de hidrógeno con la celulosa y que la actividad endógena de XET de las plantas da como resultado la incorporación de XGO radiactivo y fluorescente en el componente de xiloglucano de cultivos de suspensión celular de plantas (véase Biochem J. 279, 1991, páginas 529-535 y Plant Cell Physiol 40, 1999, páginas 1172-1176).

Los inventores comprobaron entonces que los polímeros de xiloglucano aislados pueden ser química y/o enzimáticamente modificados para contener una amplia gama de grupos químicos diferentes y que dichos polímeros de xiloglucano químicamente modificados se pueden utilizar como interface para introducir nuevos grupos químicos sobre las superficies de las fibras celulósicas. Una ventaja importante del método es que la utilización de estos polímeros de interface evita la pérdida subsiguiente de estructura de fibra y rendimiento con las que suele tropezarse cuando se trata de modificación química directa de la celulosa. Los inventores han comprobado que una enzima de transglicosilación como XET puede utilizar como azúcares aceptores, oligosacáridos que contienen diferentes tipos de grupos químicos.

Como el agua no compite como aceptor de transglicosilación para estas enzimas, se pueden utilizar en soluciones acuosas para incorporar de modo eficaz dichos grupos químicos sobre los polímeros de interface, como el xiloglucano, en solución o unido a otro material polimérico como celulosa. Además, los inventores han comprobado que el xiloglucano incluso químicamente modificado se une fuertemente a la superficie de la celulosa y que los grupos químicos introducidos, incluso si se ligan a las superficies porosas de materiales celulósicos a través de XG, siguen siendo sin embargo accesibles a reacciones químicas ulteriores. Los inventores han comprobado también que añadiendo una enzima de transglicosilación y CPF modificados a SCP, resultaba sorprendentemente posible ligar muchos grupos químicos nuevos diferentes con una funcionalidad deseada sobre superficies de PCM con un rendimiento elevado.

El PCM que se va a modificar, puede derivarse de una planta elegida dentro del grupo formado por una planta monocotiledónea, como por ejemplo una planta de la familia Gramineae y una planta dicotiledónea como por ejemplo una planta elegida dentro del grupo formado por plantas angiospermas (maderas nobles), plantas coníferas (maderas blandas) y plantas pertenecientes a la familia de las *Gossypium*.

El PCM puede encontrarse en forma de fibras vegetales celulósicas o en forma de microfibrilas celulósicas derivadas de fibras vegetales celulósicas o de una bacteria.

El SCP puede formar parte del PCM que se va a modificar, y por eso, la etapa de incorporar el CPF comprende un grupo químico con una funcionalidad deseada en el SCP, por ejemplo utilizando una enzima, se puede realizar directamente sobre el complejo PCM-SCP. El principio se ilustra en la figura 3. En la parte superior de la figura 3 se puede ver que el complejo PCM-SCP (9) comprende el PCM (1) y el SCP (2), comprendiendo la enzima (7) y el CPF (4) un grupo químico con una funcionalidad deseada (5). En la parte central de la figura 3, la enzima (7) se fija al SCP (2) del complejo PCM-SCP (9) y puede formar un complejo intermedio (10). En el proceso que conduce a la parte inferior de la figura 3, la enzima (7) segmenta el SCP (2) e incorpora (12) el CPF (4) que comprende un grupo químico con una funcionalidad deseada (5). (12) es el fragmento de SCP que ha sido desprendido del SCP.

Alternativamente, el SCP no necesita asociarse con el PCM que se va a modificar. En el último caso, el SCP puede modificarse para comprender el grupo químico y el producto de la modificación de SCP, la CLM se pone entonces en contacto con el PCM. Alternativamente, se pone primero en contacto SCP con PCM menos SCP. Una vez que se ha formado el complejo SCP-PCM, la etapa de incorporación de la CPF que comprende un grupo químico con una funcionalidad deseada, el SCP, por ejemplo, utilizando una enzima, se puede realizar directamente sobre el complejo PCM-SCP.

Es posible modificar el PCM con una mezcla de grupos químicos, por ejemplo realizando los métodos descritos aquí en secuencia y/o utilizando una mezcla de CLM que comprende grupos químicos diferentes y ligando la mezcla de CLM que comprende grupos químicos diferentes al PCM en una etapa del proceso.

El SCP y/o el CPF pueden contener el grupo químico.

El CPF puede derivarse de xiloglucano y puede contener de 3 a aproximadamente 100, inclusive de 4 a 10 unidades de monosacárido esqueleto del polímero.

## ES 2 280 588 T3

En una realización, el CPF que comprende el grupo químico se pone en contacto con el carbohidrato polimérico soluble (SCP) en presencia de una enzima capaz de promover la formación del complejo constituido por dicho CPF que comprende el grupo químico y por lo menos una parte del SCP. La enzima puede ser capaz de transferir mono- u oligosacáridos nativos o químicamente modificados sobre un oligo y/o polisacárido. En una realización, la enzima puede ser una enzima que tiene actividad de transglicosilación.

En otra realización, la enzima presenta una tasa de incorporación del sustrato aceptor en el sustrato donador de por lo menos 10% de la tasa hidrolítica, por lo menos 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% ó 75%, por lo menos 100%, cuando se ensaya con un sustrato donador de glicosilo adecuado en presencia y ausencia de un sustrato aceptor mono-oligo- o polisacárido en condiciones adecuadas para mantener la actividad enzimática. El sustrato donador de glicosilo puede ser un xiloglucano y el sustrato de aceptor puede ser un xiloglucano - oligosacárido.

El ensayo para evaluar la tasa de incorporación del sustrato aceptor en el sustrato donador consta de las siguientes etapas:

(i) incubar 0,1 mg de xiloglucano, 0,1 mg de xiloglucano oligosacáridos (mezcla de XXXG, XLXG, XXLG y XLLG; 15:7:32:46 proporción pesos) en 200  $\mu$ L de tampón de citrato a 40 mM, pH 5,5 durante 30 minutos a 30°C.

(ii) detener la reacción con 100  $\mu$ L de HCL 1M.

(iii) la resistencia iónica se ajustó añadiendo 800  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 20% y 200  $\mu$ L de una solución de I<sub>2</sub> (0,5% I<sub>2</sub>, 1% KI, p/p).

(iv) medición: la absorbancia se midió a 620 nm.

(v) realizar las etapas i)-iv) sin añadir los xiloglucano oligosacáridos (XGO) de la etapa 1.

(vi) calcular el aumento de absorbancia en porcentaje desde la incubación XGO hasta la incubación sin XGO.

La enzima se puede elegir dentro del grupo formado por una transglicosilasa, una glicosil hidrolasa, una glicosil transferasa. La enzima puede ser una enzima de tipo natural o una enzima funcional y/o estructuralmente modificada derivada de esta enzima de tipo natural. En una realización, la enzima es una xiloglucano endo transglicosilasa (XET, EC 2.4.1.207).

La enzima que tiene actividad de transglicosilación puede derivarse de una planta, inclusive de una planta que pertenece a la familia de la *Brassica* y una planta de la especie *Populus* o se puede producir de modo recombinante.

En una realización, el grupo químico que tiene una funcionalidad deseada, se puede elegir dentro del grupo formado por un grupo iónico, un grupo hidrófobo, un grupo hidrofílico no cargado, un grupo reactivo, un nucleófilo, un monómero de polimerización, un grupo cromofórico, un grupo fluorofóbico, biotina, un isótopo radioactivo, un precursor de radical libre, una mitad de radical libre estable, una proteína y un agente de fijación de proteína.

Una realización de la presente invención se refiere a un método en el que el PCM modificado obtenido tiene, respecto del PCM no modificado, propiedades de superficie alteradas, como por ejemplo alteración de las propiedades de resistencia, alteración de la tensión superficial, de las propiedades repelentes del agua, alteración de la reactividad, de las propiedades ópticas o combinaciones de las anteriores.

Otro aspecto de la invención es un material de carbohidrato polimérico modificado (mPCM) que se puede obtener con cualquiera de los métodos descritos aquí, teniendo el material unos grupos químicos ligados que tienen una funcionalidad deseada, siendo mediada dicha unión por una molécula ligante de carbohidrato que comprende un grupo químico y un SCP que es una hemicelulosa, siendo capaz la molécula ligante de carbohidrato de fijar al PCM. El mPCM puede tener forma de fibras vegetales celulósicas o monofibrilas celulósicas derivadas de fibras vegetales celulósicas o de una bacteria.

Los grupos químicos del mPCM pueden ser grupos reactivos capaces de ligar otros grupos funcionales y el mPCM puede haber ligado dos o más tipos diferentes de grupos químicos.

Otro aspecto de la invención es un material compuesto que comprende los materiales aquí descritos.

Otro aspecto más de la invención se refiere a la utilización del mPCM o de los materiales compuestos en la fabricación de hojas de papel, cartón ondulado, tejidos, agentes auxiliares, en los ensayos o procesos diagnósticos o químicos, agentes de envasado para líquidos y alimentos, papeles y cartones que se suelen laminar con un termoplástico como polietileno, para proporcionar una barrera impermeable a soluciones acuosas, textiles y papeles de uso oficial, billetes de banco, agentes de relleno de documentos rastreados, laminados y productos de panel, compuestos de madera - polímero, compuestos poliméricos, aleaciones y mezclas y derivados celulósicos.

Según la presente invención, se pueden añadir nuevos grupos químicos a PCM que contiene un SCP adecuado inherente utilizando la enzima de transglicosilación para acoplar los CPF químicamente modificadas al SCP contenido

## ES 2 280 588 T3

en los materiales de celulosa. Dentro del presente contexto, el término “inherente” significa que el PCM comprende un SCP antes de la modificación. Según la presente invención, se pueden añadir también nuevos grupos químicos a PCM que no contiene SCP inherente utilizando primero la enzima de transglucosilación para acoplar los CPF químicamente modificados al SCP en solución seguido de sorción de SCP modificado sobre el PCM.

Según una realización específica de la presente invención, se pueden añadir nuevos grupos químicos a materiales de celulosa que no contienen xiloglucano inherente utilizando primero la enzima XET para acoplar los XGO químicamente modificados en xiloglucano (XG) en solución, seguido de sorción del XGO modificado sobre los materiales de celulosa.

Según la presente invención, se proporciona a un PCM una química alterada de la superficie y/o una reactividad química mejorada después de su tratamiento con CPF químicamente modificados que se acoplan a un SCP utilizando la enzima de transglucosilación. Los SCP que llevan los grupos químicamente reactivos se fijarán fuertemente a las superficies del PCM manteniendo de este modo la reactividad química de dichas superficies. La reactividad química *per se* o si ha sido modificada por reacciones ulteriores químicas y/o de polimerización influye en las propiedades de la superficie del PCM. Además, la densidad de los grupos químicamente reactivos se controla alterando las concentraciones de la enzima de transglucosilación y/o los CPF y/o el tiempo de reacción, tal como se muestra en los ejemplos 14a y 14b. Las propiedades superficiales se pueden medir con cualquier método conocido en el estado de la técnica según se muestra en los ejemplos adjuntos, por ejemplo el Ejemplo 16b.

En la naturaleza, las enzimas de transglucosilación como la enzima XET, funcionan in vivo, en la planta viva, de modo que la enzima puede trabajar, como se ve, en un entorno acuoso. El método según la invención se puede realizar por lo tanto en una solución acuosa, o puede realizarse en agua en presencia de ciertos componentes tales como un tampón y/o un agente humectante y/o un estabilizador y/o un polímero y/o un componente orgánico reductor de la actividad del agua como DMSO.

El tampón puede ser adecuadamente un fosfato, borato, citrato, acetato, adipato, trietanol amina, mono etanol amina, dietanol amina, carbonato (especialmente carbonato de metal alcalino o alcalino terreo, en particular carbonato sódico o potásico o amonio o sales de HCl), diamina, especialmente diamino etano, imidazol, Tris, o tampón de aminoácido. El agente humectante sirve para mejorar la humectabilidad del PCM. El agente humectante es de preferencia de tipo surfactante no iónico. El estabilizador puede ser un agente que estabiliza la enzima.

Será por lo general apropiado incubar el medio de reacción, que comprende por ejemplo el PCM, la CLM y opcionalmente uno o más componentes elegidos dentro del grupo SCP, que puede comprender o no un grupo químico, un CPF que comprende un grupo químico y una enzima) durante un período de por lo menos unos pocos minutos, según las condiciones de reacción. Será por lo general adecuado un tiempo de incubación de aproximadamente 1 minuto a 20 horas, aproximadamente 2-5 minutos, 5-7 minutos, 7-10 minutos, 10-15 minutos, 15-20 minutos, 20-30 minutos, 30-40 minutos, 40-60 minutos, 1-2 horas, 2-4 horas, 4-6 horas, 6-8 horas, 8-10 horas, 10-12 horas, 12-14 horas, 14-16 horas, 16-18 horas, o 18-20 horas. En particular, se suele preferir un tiempo de incubación de 30 minutos a 10 horas. El tiempo de incubación se controla de preferencia con un intervalo de tiempo inferior a  $\pm 5$  horas,  $\pm 2$  horas,  $\pm 1$  hora,  $\pm 45$  minutos,  $\pm 30$  minutos,  $\pm 15$  minutos,  $\pm 10$  minutos,  $\pm 5$  minutos,  $\pm 2$  minutos,  $\pm 1$  minuto,  $\pm 30$  segundos,  $\pm 30$  segundos,  $\pm 10$  minutos,  $\pm 1$  segundo,  $\pm 0,1$  segundos o  $\pm 0,01$  segundo.

La temperatura del medio de reacción en el proceso de la invención puede oscilar adecuadamente entre  $-5$  y  $100^{\circ}\text{C}$ , por ejemplo,  $0-5$ ,  $5-10$ ,  $10-15$ ,  $15-20$ ,  $20-25$ ,  $25-30$ ,  $30-33$ ,  $33-36$ ,  $36-38$ ,  $38-40$ ,  $40-50$ ,  $50-60$ ,  $60-70$ ,  $70-80$ ,  $80-90$  ó  $90-100^{\circ}\text{C}$ . En realizaciones en las que la mezcla de reacción comprende una enzima, la temperatura de la mezcla de reacción durante la incubación será de preferencia cercana a la temperatura que crea el turnover óptimo durante la incubación, por ejemplo menos de  $10^{\circ}\text{C}$ ,  $8^{\circ}\text{C}$ ,  $6^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $2^{\circ}\text{C}$ ,  $1^{\circ}\text{C}$ ,  $0,5^{\circ}\text{C}$  ó  $0,1^{\circ}\text{C}$ .

Para fijar el SCP modificada o no modificada al PCM, será por lo general conveniente incubar la mezcla durante un período de por lo menos unos pocos minutos, según las condiciones de reacción. Un tiempo de incubación de aproximadamente un minuto a 48 horas será por lo general adecuado, en particular se prefiere por lo general un tiempo de incubación de 30 minutos a 10 horas. La solución de incubación puede estar tamponada adecuadamente dentro de la gama de pH 2-11, de preferencia pH 5-8, con una concentración de tampón comprendida entre 0 y 5 M, de preferencia 0,0 y 0,1 M. La temperatura del medio de reacción en ese proceso puede oscilar convenientemente entre 10 y  $100^{\circ}\text{C}$  según la estabilidad de los componentes individuales de la mezcla.

La invención se describirá ahora más detalladamente con referencia a las figuras adjuntas donde:

La figura 1 ilustra el principio de modificación de un material de carbohidrato polimérico,

La figura 2 ilustra el principio de incorporar un polímero carbohidrato soluble que comprende un grupo químico en un material de carbohidrato polimérico,

La figura 3 ilustra el principio de modificar PCM que comprende SCP antes de la modificación,

La figura 4 muestra ejemplos de estructuras de xiloglucano oligosacáridos (XGO-7, (XXXG), XGO-8 (XLXG, XXLG) y XGO-9 (XLLG)),

## ES 2 280 588 T3

La figura 5 ilustra la dependencia respecto del tiempo de la producción de XG-FITC,

La figura 6 ilustra la dependencia de la producción de XG-FITC respecto de la cantidad de enzima en la reacción,

5 La figura 7 muestra una imagen microscópica de fluorescencia confocal de papel tratado con XG-FITC,

La figura 8 muestra una foto de la incorporación de fluoresceína en papel tratado con XG-NH<sub>2</sub>,

10 La figura 9 ilustra las cantidades relativas de grupos amino presentes en la superficie de papel celulósico modificado con XG-NH<sub>2</sub> después del tratamiento con diversos reactivos amino-reactivos.

La figura 10 ilustra la reactividad del papel, con y sin modificación por XG-NH<sub>2</sub> hacia FITC y,

15 La figura 11 ilustra la reacción de papel tiolado con sulforhodamina metano tiosulfonato.

### Ejemplos

#### *Materiales y métodos*

20 *Determinación de la actividad enzimática y en particular de la actividad de XET*

##### *a. Ensayo radiométrico*

25 Los presentes inventores han desarrollado un método de ensayo modificado similar al de Steele, N. *et al.* (Phytochemistry, 2000, 54, 667-680) que se utilizó del siguiente modo. Se añadió [1-<sup>3</sup>H]-XLLGol (300  $\mu$ l, 0,36  $\mu$ mol en H<sub>2</sub>O) a xgo-9 alditol no radiactivo (700  $\mu$ l, 8,6 mol) en tampón de citrato fosfato 50 mM pH 5,5. Cuando se utilizaba el ensayo, este stock se diluyó en tampón hasta una concentración de 2,24  $\mu$ mol/ml (3,1 mg/ml). Se añadió stock XLLGol radiactivo (10  $\mu$ l, 2,24  $\mu$ mol/ml) a xiloglucano (10  $\mu$ l, 3,0 mg/ml en tampón). Se añadió solución enzimática diluida (10  $\mu$ l) y la mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 30 minutos. Se detuvo entonces la reacción con una  
30 solución al 50% de ácido fórmico en agua (20  $\mu$ l). La mezcla de reacción (40  $\mu$ l) se secó sobre redondeles de papel de cromatografía Whatman 3MM (diámetro 20 mm). Los redondeles se lavaron durante 4 horas bajo agua corriente, se secaron en un horno a 65°C y se analizó la incorporación radiactiva en viales de centelleo que contenían cocktail de centelleo Ready-safe (6 ml, Beckman Coulter AB, Bromma, Suecia) con un contador de centelleo Packard Tricarb 1500. No había elución de radiactividad del papel al líquido de centelleo. Se midieron los blancos añadiendo ácido hasta  
35 la reacción antes de la enzima, se midió el control de la radiactividad total añadida no lavando los redondeles de papel de control. Se obtuvo la medida de cómo el papel de filtro afectaba el ensayo comparando controles con recuentos de centelleo de la mezcla de control sin papel de filtro .

##### *b. Ensayo colorimétrico*

40 Se midió la actividad enzimática según el protocolo modificado basado en el Sulová *et al.* (1995) Anal. Biochem. 229-80-85. Se incubó XET con un 0,1 mg de xiloglucano, 0,1 mg de xiloglucano oligosacáridos (mezcla de XXXG, XLXG, XXLG y XLLG; 15:7:32:46) en 200  $\mu$ L de tampón citrato de mM, pH 5,5 durante 30 minutos a 30°C. El ensayo se interrumpió con 100  $\mu$ L de HCl 1M, se ajustó la resistencia fónica con 800  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se añadió 200  $\mu$ l  
45 de una solución de I<sub>2</sub> (0,5% I<sub>2</sub>, 1% KI, p/p). La absorbancia se midió a 620 nm. Para los fines del presente documento, una unidad de actividad enzimática se define como 0,1 unidades de cambio de absorbancia (después de la corrección para hidrólisis de fondo) durante 30 minutos.

#### Ejemplo 1

50 *Extracción de XET de la coliflor*

55 La extracción de coliflor se preparó homogenizando los flósculos de la coliflor en tampón citrato helado (0,35 M, pH 5,5 que contenía CaCl<sub>2</sub> 10 mM), y filtrando la mezcla a través de miracloth. El filtrado se diluyó con agua ultrapura (18 M $\Omega$ .cm) hasta que la conductividad de la solución era la misma que la del tampón de acetato de amonio 0,1M pH 5,5. La solución se agitó entonces suavemente con el cambiador de cationes SP-Fast Flow (Amersham Biosciences, Suecia) durante 1 hora a 4°C. El gel SP-FF se recogió sobre un filtro de fritada y se lavó con acetato de amonio 0,1 M, pH 5,5, hasta que el filtrado fuera claro. El gel se envasó en una columna y se eluyeron proteínas ligadas con un gradiente lineal de 0 a 1,0 M NaCl en acetato de amonio 0,1 M, pH 5,5, sobre 10 volúmenes de columna. Las  
60 fracciones que contenían actividad XET se agruparon y se mezclaron con sulfato de amonio (1 M). La muestra se aplicó a una columna Resource-ISO (1 ml, Amersham Biosciences, Suecia) y luego se eluyó con un gradiente lineal de 1,0 M a 0 sulfato de amonio en acetato de amonio, pH 5,5, sobre 20 volúmenes de columna. Las fracciones que contenían actividad XET se agruparon y se analizó su pureza con SDS-PAGE y plateado. El gel solo mostró una banda que se confirmó era XET por inmunotransferencia.

65

## ES 2 280 588 T3

### Ejemplo 2

#### *Extracción de XET del cultivo de suspensión celular de álamo híbrido, Populus tremula x tremuloides Mich*

5 Se extrajo XET de álamo blanco homogenizando material de un cultivo celular granular en tampón de citrato helado (0,35 M, pH 5,5 que contenía CaCl<sub>2</sub> 10 mM), agitando la mezcla durante 2 horas a 4°C, y filtrándola a través de miracloth. El filtrado se diluyó con agua ultrapura (18 MΩ.cm) hasta que la conductividad de la solución era igual a la del tampón de acetato de amonio 0,1 M, pH 5,5. La solución se agitó entonces suavemente con cambiador de cationes SP-Fast Flow (Amersham Biociencias, Suecia) durante 1 hora a 4°C. El gel SP-Trisacrilo se recogió y se lavó  
10 con acetato de amonio 0,1 M, pH 5,5 a través de un filtro de vidrio fritado, hasta aclarar el filtrado. El gel se introdujo dentro de una columna y se eluyeron las proteínas ligadas con un gradiente lineal de 0,0 a 1,0 M NaCl en acetato de amonio 0,1 M, pH 5,5, sobre 10 volúmenes de columna. Se agruparon fracciones que contenían actividad XET, se cambió el tampón por acetato de amonio 0,1M, pH 5,6 en una columna de exclusión de tamaño Sephadex G-25 y se introdujo en una columna de intercambio de cationes Resource S (1 ml, Pharmacia). Las proteínas ligadas se eluyeron  
15 con un gradiente lineal de 0,0 a 1,0 M NaCl en acetato de amonio 0,1 M, pH 5,5 sobre 10 volúmenes de columna. Se agruparon fracciones que contenían actividad XET, se aplicaron a una columna Sephacryl S200 (120 ml, Amersham Biociencias, Suecia), y se eluyeron con 2 volúmenes de columna de acetato de amonio 0,1 M, pH 5,5. Se agruparon fracciones correspondientes al último pico, que contenían la cantidad más alta de actividad XET, y se aplicaron a la columna Resource S (1 ml Amersham Biociencias, Suecia). Seguidamente se eluyeron fracciones con un gradiente  
20 lineal de 0,0 a 0,5 M NaCl en acetato de amonio 0,1M, pH 5,5 en un volumen correspondiente a más de 10 volúmenes de columna. Se agruparon fracciones que contenían actividad XET y resultaron ser homogéneas en SDS-PAGE.

### Ejemplo 3

#### *Purificación de XET recombinante a partir de cultivo de Pichia pastoris*

Las células de cultivos de *Pichia pastoris* transformadas con el material genético que codifica XET (véase ejemplos 4 y 5), mostraron por lo general la actividad XET más elevada en el medio de cultivo tras tres días de inducción de metanol. Estas células de levadura se cosecharon por centrifugación y los medios de cultivo se filtraron después a través  
30 de un filtro de 0,45 μm y luego se concentraron y desalaron por ultrafiltración. La XET se purificó por cromatografía de cambio de cationes de dos etapas. El filtrado de cultivo concentrado (en un tampón de acetato de amonio 0,1M pH 5,5) se aplicó primero a una columna SP-trisacrilo y luego se eluyó mediante un gradiente lineal de 0 a 1 M NaCl en acetato de amonio 0,1M pH 5,5. Las fracciones que contenían actividad XET se agruparon, desalaron, hasta obtener acetato de amonio 0,1M pH 5,5 y se aplicaron a una columna Resource S, se eluyeron ulteriormente con el mismo  
35 gradiente lineal de sal utilizado en la cromatografía de cambio de cationes de primera etapa. La homogeneidad de la proteína se examinó con SDS-PAGE y plateado. Solo apareció una banda con un peso molecular de aproximadamente 32 kDa y se confirmó por inmunotransferencia que era XET. Se vio que el protocolo surtía efecto para la expresión de todas las secuencias SEQ ID NO: 1, 2, 3 que codifican diferentes isoenzimas de XET.

### Ejemplo 4

#### *Aislamiento del gen codificador de XET a partir de la coliflor*

Se aisló cADN correspondiente al gen de XET por extracción de ARN machacando tejidos frescos de coliflor  
45 bajo nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>) y Usando las células en condiciones de desnaturalización. La muestra de célula lisada se centrifugó entonces a través de una columna QIA Shreder para eliminar el material insoluble. El ARN se ligó luego de forma selectiva a una membrana ARNeasy, se lavó con tampón y finalmente se eluyó en agua. El cADN de XET se preparó utilizando una reacción en cadena de polimerasa de 2 etapas (PCR) según el protocolo conocido en el estado de la técnica. La primera cadena de cADN se sintetizó utilizando 1 μg de ARN y un oligo dT<sub>(18)</sub> iniciador con  
50 transcriptasa inversa a 55°C durante 1 hora. Las plantillas para los iniciadores degenerados de la reacción específica PCR se obtuvieron por secuenciación N-terminal de la proteína XET de coliflor que indicaba una secuencia

IPPRKAIDVPFGRNY

55 Las secuencias de todos los iniciadores utilizados se muestran en el cuadro 1. El iniciador inverso CFXETR1, y los iniciadores encajados CFXET F1 se utilizaron para un PCR encajado de dos etapas lo cual dio como resultado un producto PCR con el peso molecular correcto y una secuencia correspondiente a XET en la familia glicosil hidrolasa / transglicosilasa 16. El cADN de longitud total se amplificó entonces utilizando una serie de iniciadores encajados degenerados (Cuadro 1) seguido de determinación de secuencia del cADN de longitud total (SEQ ID NO: 1).  
60

65

# ES 2 280 588 T3

## CUADRO 1

### *Iniciadores utilizados en los ejemplos*

5

10

15

20

25

30

CFXETF1	AARGCNATHGAYGTNCCNTTYGG
CFXETF2	CCNCCNAGRAARGCNATHGAYGT
CFXETR1	AAAYTCRAARTCDATYTCRTRCRTGYTC
CFXET -5r-1	TGCAGTGACGACCCAGCGGT A TC
CFXET -5r-2	CAGCGGTATCACCAGCCGGCAG
CFXET -3r-1	CTGCCGGCTGGTGATACCGCTG
CFXET -3r-2	GAT ACCGCTGGGGTCGTCCTGCA
5'RACE OUTER	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG
5'RACE INNER	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG
3'RACE OUTER	GCGAGCACAGAATTAATACGACT
3'RACE INNER	CGAGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG
CF FL-F1	AACATCATTATCATCATCACCATCACC
CF FL-F2	CATCACCATCACCATCACCATAACATCT
CF FL RI	TGAACAGAAGCATAATACTCATAATAATCCGG
CF FL R2	CATAATAATCCGGTTCATTGAAAGTTTCG

Código IUB para bases mezcladas / mixtas: M=A+C, R=A+G, W=A+T, S=G+C, Y=C+T, V=A+G+C, H=A+C+T, B=G+T+C, N=A+G+C+T, K=G+T.

35

Los iniciadores CFXETF1, CFXETF2 y CFXETR1 son iniciadores degenerados específicos de gen para RT PCR, CFXET-5r-1, CFXET-5r-2, CFXET-3r-1 y CFXET-3r-2 son iniciadores internos específicos de gen mientras que 5'RACE OUTER, 5'RACE INNER, 3'RACE OUTER y 3'RACE INNER son iniciadores complementarios de los adaptadores de los RLM-RACE, CF- FL-F1, CF-FL-F2, CF-FL-RI son iniciadores específicos de CF-FL-R2 para la amplificación del cADN de longitud total.

40

#### Ejemplo 5

##### *Aislamiento del gen que codifica la XET del álamo blanco híbrido*

45

El cADN que codifica una XET de álamo se aisló por ejemplo a partir de una biblioteca EST cambial de álamo blanco híbrido, construida en la forma descrita en Hertzberg *et al.* 1998. La anotación de la biblioteca reveló tres secuencias correspondientes a enzimas del tipo XET. La secuenciación de longitud total de uno de los clones reveló que contenía una copia de cADN de una enzima XET de longitud total designada XET16A (SEQ ID NO: 3) mientras que otro clon correspondía a una segunda enzima XET de longitud total designada XET16C (SEQ ID NO.2).

50

#### Ejemplo 6

##### *Extracción de xiloglucano de polvo de grano de tamarindo*

55

60

65

Se modificó del siguiente método el método de Edwards *et al* (Planta 1985, 163, 133-140). Se disolvió NaBH<sub>4</sub> (0,75 g) en NaOH 2,0 M (1,5 L). Se añadió polvo de grano de tamarindo (30 g) desaceitado a la solución de forma lenta, agitando vigorosamente (agitador de palas) para evitar la formación de grumos. La mezcla se calentó entonces a 90°C y se mantuvo a dicha temperatura durante una hora, agitando continuamente. Después de enfriar parcialmente, se filtraron sólidos a través de fibras de cristal y se descartaron. Después de enfriar nuevamente, se acidificó el filtrado añadiendo lentamente ácido acético glacial (300 ml) seguido de adición lenta de EtOH (3,0 l) para precipitar xiloglucano en forma de masa gelatinosa incolora. Los sólidos se recogieron por filtración a través de un paño de algodón y se descartó después el filtrado. El xiloglucano se disolvió entonces en agua pura (1,5 L, 18 MΩ.cm) calentando suavemente y se reprecipitó añadiendo lentamente EtOH (3,0 L). La masa sólida se recogió por filtración a través de un paño de algodón, retorcido manualmente para liberar el exceso de filtrado. Los sólidos se secaron después bajo presión reducida (bomba de aceite) y machacados en un molino de café domestico (Braun) obteniéndose un polvo fino (17 g).

## ES 2 280 588 T3

### Ejemplo 7

#### *Producción de xiloglucano oligosacáridos mediada por endoglucanasa*

5 Se disolvió xiloglucano (3 g) en 200 ml de agua purificada (18 MΩcm) a 50°C agitando fuertemente. Después de enfriar a 30°C, se añadió celulosa (30 mg, 4 U/mg, de *T. raesei*, Fluka) y se mantuvo la solución a dicha temperatura durante la noche. Se añadió entonces carbón activado (3 g) y la mezcla se agitó durante 15 minutos. Tras la adición de acetonitrilo (200 ml), se filtró la mezcla a través de un tampón de celite sobre papel de fibra de vidrio (Whatman GF/A). El filtrado se concentró entonces en vacío (aspirador de agua) y el disolvente residual se quitó con una bomba (de aceite) de alto vacío. La mezcla de xiloglucano-oligosacáridos (XXXG, XLXG, XXLG y XLLG en la proporción molar 15:7:32:46 según determinó por cromatografía de cambio de aniones de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada, HPAEC-PAD) se fraccionó mediante HPLC semi-preparativo en una columna Amide-80 (TosoHaas, 21,5 mm x 300 mm, eluyente 55:45 acetonitrilo - agua) en la medida de lo necesario. XXXG y XXLG no eran resolubles en estas condiciones. Se utilizó espectrometría de masas por ionización electrospray (Micromass Q-TOF2) para confirmar la identidad de los oligosacáridos.

20 Se disolvió xiloglucano (3 g) en 200 ml de agua pura (18 MΩ.cm) a 50°C agitando vigorosamente. Después de enfriar a 30°C, se añadió celulosa (30 mg, 4 U/mg de *Trichoderma reesei*, Fluka) y la solución se mantuvo a dicha temperatura durante la noche. Se añadió entonces Beta - galactosidasa (150 mg, 9 U/mg contra lactosa, de *Apergillus oryzae*, Sigma G-5160) y la solución se agitó durante una hora a temperatura ambiente. La solución se hirvió durante 3 minutos, seguido de rápido enfriamiento antes de añadir carbón activado (3 g). La mezcla se agitó entonces durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la adición de acetonitrilo (200 ml), la mezcla se filtró a través de un tampón de celite sobre papel de filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/A). El filtrado se concentró entonces en vacío (aspirador de agua) y el disolvente residual se eliminó con una bomba (de aceite) de alto vacío. La mezcla de xiloglucano - oligosacáridos se fraccionó entonces por HPLC semi - preparativo sobre una columna Amide-80 (TosoHaas, 21,5 mm x 30 mm, eluyente 55:45 acetonitrilo-agua). Se utilizó espectrometría de masa por ionización electrospray (Micromass Q-TOF2) para confirmar la identidad de los oligosacáridos.

### Ejemplo 8

#### *Preparación de derivados de aminoalditol de xiloglucano-oligosacáridos (XGO-NH<sub>2</sub>)*

35 Se disolvieron xiloglucano - oligosacáridos (2,4 g, 1,9 mmol, mezcla de XXXG, XLXG, XXLG y XLLG) en una solución de carbonato ácido de amonio saturado (50 ml). Se añadió entonces ciano boro hidruro sódico (2,4 g, 38 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de 7 días, se filtró la reacción y se añadió ácido acético hasta la solución alcanzó un pH 2. Tras la concentración en vacío, se redisolvió el producto crudo en 75 ml de agua y se aplicó en diez porciones a una columna P2 (Bio-rad, Bio-Gel, 5 cm x 22 cm). Se agruparon fracciones de cada vertido de columna, que contenían XGO-NH<sub>2</sub> y presentaban una conductividad reducida, y se concentraron hasta secar (rendimiento 1,31 g, 51%). Se utilizó espectrometría de masas por ionización electrospray (Micromass Q-TFO2) para confirmar la identidad de los oligosacáridos modificados.

### Ejemplo 9

#### *Preparación de derivados de sulforhodamina de xiloglucano - oligosacáridos (XGO-SR)*

45 Se disolvieron XGO amino alditos (XGO-NH<sub>2</sub>, 0,5 g, 0,4 nM, mezcla de XXXG-NH<sub>2</sub>, XLXG-NH<sub>2</sub>, XXLG-NH<sub>2</sub> y XLLG-NH<sub>2</sub>) en tetraborato sódico acuoso al 30% (30 ml). Se disolvió cloruro ácido de sulforhodamina B (192 mg, 0,3 mM, Fluka 86186) en dimetil formamida (DMF, 1 ml) y se añadió gota a gota a la solución agitada. La reacción se controló por TLC (5:4:1 cloroformo: metanol: agua) y se concentró hasta secar después de 7 días. El producto crudo se purificó por cromatografía flash de gel de sílice (elución por etapas con 55:45:5 y 5:4:1 cloroformo: metanol: agua). Para eliminar las trazas de sílice del producto, el material se introdujo en una columna de cromatografía de fase inversa (Superclean ENVI-18 SPE tube, 6 ml, Supelco, Bellefonte, PA, USA) y se eluyó mediante un gradiente gradual de agua desionizada, acetonitrilo acuoso al 10% y acetonitrilo acuoso al 20%) (rendimiento: 20 mg, 2,7%).

### Ejemplo 10

#### *Preparación de derivados de fluoresceína de xiloglucano - oligosacáridos (XGO-FITC)*

60 Se añadió isómero I isotiocianato de fluoresceína (FITC, 12 mg, 0,03 mmol, Fluka 46952) a una solución de XGO amino alditos (XGO-NH<sub>2</sub>, 45 mg, 0,036 mmol, mezcla de XXXG-NH<sub>2</sub>, XLXG-NH<sub>2</sub>, XXLG-NH<sub>2</sub> y XLLG-NH<sub>2</sub>) en tampón de bicarbonato sódico (100 mM, pH 9,0, 20 ml). La reacción se controló por TLC (70:30:1 acetonitrilo: agua: ácido acético) y se concentró hasta secar en vacío después de agitar durante 24 horas a temperatura ambiente. El producto crudo se redisolvió en 1,5 ml de agua ultrapura, se aplicó a una columna P2 (Bio-rad, Bio-Gel P2, 1,6 cm x 50 cm), y se eluyó con 10 mM de bicarbonato de amonio acuoso a un caudal de 0,2 ml/min. Todas las fracciones se analizaron por TLC (70:30:1 acetonitrilo: agua: ácido acético), lo cual indicaba que el FITC y XGO-NH<sub>2</sub> que no había reaccionado se había separado con éxito del producto deseado. Se agruparon fracciones que contenían XGO-FITC (detectado por un detector UV en línea y TLC) y que presentaban una conductividad baja y se concentraron en

## ES 2 280 588 T3

vacío para obtener un sólido naranja (rendimiento: 34 mg, 60%). Se utilizó espectrometría de masas por ionización electrospray (Micromass Q-TOF2) para confirmar la identidad de los oligosacáridos modificados.

### Ejemplo 11

5

*Síntesis de derivados de alditol radiactivo y no radiactivo de XLLG xiloglucano - oligosacárido ([1-<sup>3</sup>H])-XLLGol y ([1-<sup>1</sup>H])-XLLGol*

Se disolvió xiloglucano - oligosacárido XLLG (8,8  $\mu\text{mol}$ ) en agua purificada (250  $\mu\text{l}$ , 18 M $\Omega\cdot\text{cm}$ ), que se había ajustado a un pH de 11,5 con NaOH. Se añadió entonces NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> (8,2  $\mu\text{mol}$ , 3,76 GBq) y se dejó que la reacción permaneciera durante la noche a temperatura ambiente. Se interrumpió la reacción añadiendo cuidadosamente ácido acético glacial hasta que el pH de la solución fue de aproximadamente 4. Se dejó entonces estar la solución durante un período de 30 minutos para permitir que el gas tritio se escapara por la campana de los humos. Se eliminaron las sales del producto mediante cromatografía por filtración de gel sobre resina Bio-Gel P2 (Bio-Rad, volumen del lecho 20 ml) con agua purificada (18 M $\Omega\cdot\text{cm}$ ), como eluyente. Se recogieron fracciones de aproximadamente 1 ml de volumen. Las fracciones se analizaron por recuento de centelleo líquido y cromatografía de capa fina (gel de sílice, 7:3 eluyente acetonitrilo - agua, tinción molibdato de amonio / ácido sulfúrico). Se agruparon las fracciones que eran radiactivas y contenían un producto con un R<sub>f</sub> idéntico a XLLG. El test cualitativo Tollens para reducir azúcares en este producto fue negativo lo cual indicaba que la reacción de reducción había finalizado. El producto tenía una radioactividad de 115270 Bq/ $\mu\text{l}$ .

La síntesis de XLLGol no radiactivo se realizó de forma idéntica a la descrita anteriormente con la diferencia de que NaBH<sub>4</sub> sustituyó a NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> como agente reductor. La evaporación del disolvente de cromatografía dio como resultado el producto en forma de polvo blanco, con un espectro NMR protón idéntico al indicado anteriormente (York, W. *et al.*, Carbohydrate Research 1990. 200, 9-31). El rendimiento medio de tres reacciones (50 (+/-) 3%) se utilizó para estimar el rendimiento de la síntesis radioactiva, que indicaba una concentración de 1,21 x 10<sup>-9</sup> mol/L y una actividad específica de 95 MBq/ $\mu\text{l}$ .

### Ejemplo 12

30

*Preparación de membranas de celulosa regeneradas*

a. *Preparación de membrana de celulosa regenerada a partir de solución de cupro - amonio*

Según el método de Okajima [Okajima, K, (1995), Polymer Journal, 27(112), 1113-1122], se disolvieron 10 g de célula (Whatman N°. 1 papel de filtro, RU) en una mezcla de 65 g NH<sub>4</sub>OH (20%), 12 g de Cu(OH)<sub>2</sub> recién preparado, 8 g de NaOH al 10% (p/p) y 30 g de agua para obtener una solución viscosa azul clara a 4°C. La solución se vació sobre una placa de cristal para obtener un espesor de 0,3 mm y luego se colocó en baños de coagulación mantenidos a 4°C de NaOH acuoso al 10% seguido de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acuoso a 4% durante 5 minutos cada uno, respectivamente. La láminas de celulosa regeneradas obtenidas se lavaron en agua corriente y se secaron sobre una placa de cristal a temperatura ambiente.

b. *Preparación de membrana de celulosa regenerada a partir de solución acuosa de NaOH/urea*

Se utilizó tela no tejida Bemliese® de linteres de algodón en solución de cupro-amonio (DP= 650, Asahl Chemical Industry Co. Ltd. Japón) como fuente de celulosa. Se disolvieron 10 g de una tela no tejida Bemliese® en 200 ml de solución acuosa de NaOH 6% en peso / urea 4% en peso para obtener una solución de celulosa clara a 4°C. La solución se vertió sobre una placa de cristal para dar un grosor de 0,5 mm y luego se sumergió inmediatamente en una solución acuosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% en peso para permitir la coagulación durante 5 minutos a 4°C. Las membranas transparentes obtenidas se lavaron con agua corriente y se secaron en aire sobre una placa de cristal a temperatura ambiente.

### Ejemplo 13

*Incorporación mediada por XET de xiloglucano oligosacáridos modificados por sulforhodamina (XGO-SR) en xiloglucano en solución*

Se incorporó químicamente sulforhodamina fluorófora en el extremo reductor de xiloglucano oligosacáridos para producir XGO-rhodamina según lo descrito en el Ejemplo 8. Se incubó a temperatura ambiente (22°C) durante 10 minutos, una mezcla (4 ml) de xiloglucano (XG, 0,5 mg/ml), XGO-rhodamina (0,5 mg/ml) y XET (0,025 mg/ml) en tampón de acetato de amonio (50 mM, pH 5,5). La reacción se terminó eluyendo la mezcla de reacción a través de una columna HiTrap SP FF (Amersham Biosciences, Suecia) para quitar la enzima XET. Se modificó aproximadamente el 25% de XG añadida con XGO-rhodamina, según se determinó colorimétrico de Koolman [Koolman, P. (1960), Red. Trav. Chim. Pay-bas, 79, 675-678].

65

## ES 2 280 588 T3

### Ejemplo 14

*Incorporación mediada por XET de xiloglucano oligosacáridos modificados por fluoresceína (XGO-FITC) en xiloglucano en solución*

Se incorporó químicamente isómero I de fluoresceína isotiocianato en el extremo reductor de xiloglucano oligosacáridos para producir XGO-FITC tal como se describe en el Ejemplo 10. Los efectos de la concentración enzimática de XET y el tiempo de reacción sobre la incorporación de XGO-FITC en xiloglucano en solución se analizaron del siguiente modo.

#### a. Dependencia respecto del tipo

Se incubaron muestras que contenían una mezcla (200  $\mu$ l volumen total) de xiloglucano (XG, 1 mg/ml), XGO-FITC (0,5 mg/ml) y XET (8 unidades) en tampón de citrato (20 mM, pH 5,5) a 30°C durante 5, 10, 20, 40, 60, 120, 180, 300 y 360 min. En el momento adecuado se terminó cada reacción calentando a 75°C durante 5 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente se añadieron 400  $\mu$ l de etanol y la mezcla se centrifugó a 12000 g durante 5 minutos a 4°C para precipitar XG modificado y no modificado dejando XGO-FITC en solución. Se secaron el precipitado y el sobrenadante bajo vacío y se redisolviéron en 200  $\mu$ l de agua por separado. Se incorporaron 0,019, 0,025, 0,031, 0,038, 0,041, 0,042, 0,043, 0,044 mg de XGO-FITC en el extremo reductor de xiloglucano en las muestras de 5, 10, 20, 40, 60, 120, 180, 300 y 360 minutos, respectivamente según se determinó por la absorción UV a 495 nm de la solución de precipitado redisoluelto utilizando una línea standard de soluciones XGO-FITC de concentración creciente. Los resultados se muestran en la figura 5.

#### b. Dependencia enzimática

Se incubó una mezcla (200  $\mu$ l volumen total) de xiloglucano (XG, 1 mg/ml), XGO-FITC (0,5 mg/ml) en tampón de citrato (20 mM, pH 5,5) con cantidades decrecientes de XET (32,0, 16,0, 14,4, 12,8, 9,6, 6,4, 4,8, 3,2, 1,6 y 0,8 unidades) a 30°C durante 40 minutos. En ese momento, las mezclas de reacción se trataron exactamente como se describe en el Ejemplo 13b. Utilizando este procedimiento, se vio que se había incorporado 0,042, 0,038, 0,038, 0,037, 0,034, 0,031, 0,027, 0,022, 0,015 y 0,009 mg de XGO-FITC al extremo reductor de xiloglucano, en las muestras que contenían 32,0, 16,0, 14,4, 12,8, 9,6, 6,4, 4,8, 3,2, 1,6 y 0,8 unidades de enzima de XET respectivamente. Los resultados se muestran en la figura 6.

### Ejemplo 15

*Adsorción de xiloglucano modificado por sulforhodamina sobre materiales de celulosa*

Se sumergieron materiales celulósicos (0,1 g tira de papel de filtro Munktell) en la solución que contenía XG modificado por rhodamina (4 ml, producido según el método del ejemplo 10) y se agitaron en un mezclador (end-over-end) durante la noche (aproximadamente 15 horas) a temperatura ambiente. Se analizó la fijación de XG sobre las fibras celulósicas (11,4 mg XG/g celulosa) por la pérdida de XG de la solución, según se determina con el método colorimétrico de Koolman. El material celulósico se quitó entonces de la solución original y se lavó repetidas veces con agua ultrapura en un mezclador (end-over-end) para quitar el exceso de XGO-rhodamina. Tras un abundante lavado, se observó también la adsorción de rhodamina-XG sobre celulosa en forma de coloración rosa claro bajo luz ambiente y fuerte fluorescencia con luz UV. Las muestras de control tratadas en condiciones idénticas pero que contenían solamente xiloglucano no modificado y XGO-SR eran incoloras después del lavado.

### Ejemplo 16

*Incorporación mediada por XET, de xiloglucano oligosacáridos químicamente modificados en xiloglucano pre-adsorbido sobre fibras de celulosa*

Se incubó XG (0,5 mg/ml) con fibras celulósicas durante la noche (15 horas, mezclado suave extremo contra extremo (end over end) para adsorber primero XG sobre la celulosa. Se trató entonces la celulosa XG con una mezcla de XGO-rhodamina (0,1 mg/ml) 7 XET (0,025 mg/ml) en el tampón de acetato de amonio 50 mM, pH 5,5. Después de mezclar en un mezclador extremo contra extremo a temperatura ambiente durante 4 horas, se lavó la muestra con abundante agua ultrapura. La incorporación covalente de los oligosacáridos fluorescentes se puso de relieve debido a la fuerte coloración rosa en las fibras de celulosa que también mostraron una fuerte fluorescencia bajo luz UV.

### Ejemplo 17

*Adsorción de xiloglucano modificado por fluoresceína (XG-FITC) sobre papel celulósico*

a. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos una mezcla (4 ml, volumen total) de xiloglucano (XG, 0,5 mg/ml), XGO-FITC (0,5 mg/ml) y XET (0,025 mg/ml) en tampón de acetato de amonio (25 mM, pH 5,5). La reacción se terminó eluyendo la mezcla de reacción a través de una columna HiTrap SP FF (Amersham Biosciences, Suecia) para eliminar la enzima XET. Los materiales celulósicos (0,1 g Whatman n°. 1 tira de papel de filtro) se sumergieron después en la solución y se agitaron en un mezclador extremo contra extremo durante 15 horas a temperatura ambiente.

## ES 2 280 588 T3

La fijación de XG sobre las fibras celulósicas (12,6 mg XG/g celulosa) se analizó por la pérdida de XG de solución, según se determina con el método colorimétrico de Koolman. El material celulósico se quitó entonces de la solución original y se lavó repetidas veces con agua ultrapura en un mezclador extremo contra extremo para quitar el exceso de XGO-FITC. La adsorción de XG-FITC sobre celulosa se observó como una coloración amarillo clara bajo luz ambiente y fuerte fluorescencia bajo luz UV. Las muestras de control a las que no se había añadido enzima XET a la solución XG/XGO-FITC eran incoloras y no eran fluorescentes.

b. Se incubó una mezcla (200  $\mu$ l) de xiloglucano (XG, 1 mg/ml), XGO-FITC (0,5 mg/ml) y XET (8 unidades) en tampón de citrato (20 mM, pH 5,5) a 30°C durante 60 minutos. La reacción se terminó calentando a 75°C durante 5 minutos. Se diluyeron 100 l.11 de esta solución hasta 500  $\mu$ l en agua ultrapura y el material celulósico (Whatman n°. disco de papel de filtro, diámetro 1,5 cm, 15,4 mg) se sumergió en la solución seguido de agitación en un mezclador extremo contra extremo durante 15 horas a temperatura ambiente. El papel de filtro se quitó entonces y se lavó con agua ultrapura (2 x 1 ml). Se analizó la cantidad de XGO-FITC incorporada en XG y posteriormente ligada al papel de filtro (0,0232 mg) por la pérdida de XGO-FITC de solución (inclusive las soluciones de lavado) tal como se determina por adsorción UV a 495 nm en bicarbonato sódico 0,1 M frente a una línea standard de XGO-FITC. Para cuantificar directamente la cantidad de xiloglucano modificado por FITC (XG-FITC) sobre la superficie del papel, se visualizó el papel con una cámara CCD durante la excitación fluorescente (Fujifilm imager) y un escáner de sobremesa. Se comprobó que al escanear en modo RGB todo color, la intensidad del canal azul mostraba una correlación lineal con cantidad de XG-FITC adsorbida sobre el papel. Además, se pudo extraer del papel XG-FITC ligado con NaOH acuoso 2M y cuantificar posteriormente por adsorción UV a 495 nm en bicarbonato sódico 0,1 M. Se vio que el tratamiento de XG-FITC con NaOH 2M no surtía ningún efecto sobre la absorbancia UV o la emisión de fluorescencia y el espectro de excitación del compuesto. Las imágenes de microscopia confocal mostraron que el fluoróforo estaba específicamente localizado en las superficies de la fibra y demuestra que la señal es claramente detectable pese a la porosidad del material.

En la figura 7 se muestra una microscopia de fluorescencia confocal con papel tratado con XG-FITC. Las áreas de luz indican una intensidad de fluorescencia relativa elevada y las áreas más oscuras indican una intensidad de fluorescencia relativa más baja.

### Ejemplo 18

*Adsorción de (XG-SR) modificado con sulforhodamina y xiloglucano (XG-FITC) modificado por fluoresceína sobre membranas de celulosa regeneradas*

a. Se sumergieron membranas de celulosa regeneradas (0,05 g) en una solución que contenía XG (XG-SR, 4 ml, producidos según el método del Ejemplo 13) modificado con sulforhodamina y se agitaron en un mezclador extremo contra extremo durante 15 horas a temperatura ambiente. La fijación de XG-SR a la membrana de celulosa regenerada se determinó porque la pérdida de XG-SR de la solución era de 0,3 mg/g utilizando el método colorimétrico de Koolman. El material celulósico se quitó entonces de la solución original y se lavó repetidas veces con agua ultrapura en un mezclador extremo contra extremo para eliminar el exceso de XGO-rhodamina. La adsorción de XG-rhodamina sobre celulosa se observó como una coloración rosa clara bajo luz ambiente o fuerte fluorescencia bajo luz UV. La microscopia de fluorescencia confocal indicaba que XG-SR estaba localizada en las superficies de la membrana.

b. Se incubó una mezcla (200  $\mu$ l) de xiloglucano (XG, 1 mg/ml), XGO-FITC (0,5 mg/ml) y XET (2  $\mu$ g) en tampón de citrato (20 mM, pH 5,5) a 30°C durante 40 minutos. La reacción se terminó calentando a 75°C durante 5 minutos. Las membranas de celulosa regeneradas (0,05 g) se sumergieron en la solución. La cantidad de XGO-FITC, que se incorporó a XG y se ligó posteriormente a la membrana se analizó por la pérdida de XGO-FITC de las soluciones (inclusive soluciones de lavado), según se determina por adsorción UV a 495 nm en bicarbonato sódico en 0,1 M respecto de líneas standard de XG-FITC. La microscopia de fluorescencia confocal indicaba que XG-FITC se había ligado exclusivamente a las superficies de la membrana.

### Ejemplo 19

*Preparación de xiloglucano amino-modificado (XG-NH<sub>2</sub>)*

Se incubó en tampón de citrato de 20 mM Ph 5,5 durante 30 minutos a 30°C una reacción típica que consistía en 10 mg de xiloglucano *Tamarindus indica*, 3,75 mg de oligosacáridos de xiloglucano amino modificado (mezcla de XXXG-NH<sub>2</sub>, XLXG-NH<sub>2</sub>, XXLXG-NH<sub>2</sub> y XLLG-NH<sub>2</sub>, preparado según el Ejemplo 8) y 182 unidades XET (49  $\mu$ g proteína, ensayo Bradford). La enzima se desactivó calentando a 75°C durante 10 minutos. El ensayo colorimétrico de Sulová *et al.* (1995) Anal. Biochem. 229, 80-85 mostró típicamente un cambio de 0,5 unidades de absorbancia a 620 nm tras incubación, comparable con la observada al utilizar XGO-FITC como sustrato en condiciones similares.

### Ejemplo 20

*Adsorción de xiloglucano amino modificado (XG-NH<sub>2</sub>) sobre papel celulósico*

Se diluyó 1:1 con agua xiloglucano amino modificado (XG-NH<sub>2</sub> preparado según lo descrito en el Ejemplo 19) y se incubó con una hoja de papel de filtro (Whatman n°. 1, 1,5 cm de diámetro, 15 mg) en un vial de cristal durante

## ES 2 280 588 T3

la noche a temperatura ambiente con agitación orbital. Los papeles se lavaron abundantemente con agua ultrapura. Típicamente, de 70 a 80% del xiloglucano amino modificado se adsorbió al papel, según se determinó por el método colorimétrico de Koolman. El contenido de grupos aminos sobre el papel se cuantificó con ninhidrina tal como describe Sarin *et al* (1981) Anal. Biochem, 117, 147-157, que daba 70-80 nmol de grupos aminos detectados por hoja de papel.

### 5 Ejemplo 21

*Reacción de xiloglucano amino modificado (XG-NH<sub>2</sub>) adsorbido sobre la fibra de papel celulósico con fluoresceína isotiocianato*

10 Se incubó papel celulósico (Whatman n°. 1, 1,5 cm de diámetro, 15 mg) que había sido preparado según lo descrito en el Ejemplo 20, con fluoresceína isotiocianato, isómero 1 (0,6 mg) en 500  $\mu$ l de NaHCO<sub>3</sub> 0,1M durante la noche a temperatura ambiente de viales de cristal con agitación orbital. El papel se lavó abundantemente con NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M y agua ultrapura. El papel tratado de este modo presentaba un aspecto amarillo claro bajo luz ambiente y fuerte fluorescencia. El grado de modificación se cuantificó en la forma descrita en el Ejemplo 17b. Las muestras de control de papel tratadas del mismo modo pero a las que no se había añadido XG-NH<sub>2</sub> eran incoloras y no mostraban fluorescencia.

20 En la figura 8 se muestra una foto del resultado de la incorporación de fluoresceína en papel tratado con XG-NH<sub>2</sub> y que ha reaccionado con FITC. El disco de filtro izquierdo, más oscuro se hizo reaccionar con FITC mientras que el disco de filtro derecho se trató de forma idéntica al izquierdo con la excepción de que no se había ligado XG-NH<sub>2</sub> antes de la reacción con FITC. De la figura 8 se desprende que el FITC está ligado al disco de filtro.

### 25 Ejemplo 22

*Reacción de xiloglucano amino modificado (XG-NH<sub>2</sub>) adsorbido sobre la superficie de papel celulósico con anhídrido acético*

30 Se incubó papel celulósico (Whatman n°. 1, 1,5 de diámetro, 15 mg) que había sido preparado en la forma descrita en el Ejemplo 20, con anhídrido acético 3,75 mM y trietilamina 11 mM en 2 ml de metanol anhidro durante la noche a temperatura ambiente en viales de vidrio con agitación orbital. El papel se lavó entonces con metanol seguido de un exceso de agua. La cantidad de grupos amino detectada por el ensayo cuantitativo de ninhidrina [Sarin *et al.* (1981) Anal. Biochem, 117, 147-157] se redujo un 84% comparado con una muestra de control. Se hizo reaccionar también papel acetilado producido de esta forma con fluoresceína isotiocianato en la forma descrita en el Ejemplo 20 y se cuantificó según el Ejemplo 17b lo cual indicaba que el 100% de los grupos aminos habían reaccionado respecto de un control de papel amino no modificado.

### Ejemplo 23

40 *Reacción de xiloglucano amino modificado (XG-NH<sub>2</sub>) adsorbido sobre la superficie de papel celulósico con fenilisocianato*

Se incubó papel celulósico (Whatman n°. 1, 1,5 cm de diámetro, 15 mg) que había sido preparado en la forma descrita en el Ejemplo 20, con una solución 1M de fenilisocianato en metanol (2 ml) durante la noche durante la temperatura ambiente en viales de cristal con agitación orbital. El papel se lavó entonces con metanol (3 x 5 ml, en viales) seguido de un exceso (1 L, sobre una frita) de agua. La cantidad de grupos aminos detectada por el ensayo cuantitativo de ninhidrina [Sarin *et al.* (1981) Anal. Biochem., 117-147-157] se redujo un 70% comparado con una muestra de control. El papel producido de esta forma se hizo reaccionar también con fluoresceína isotiocianato en la forma descrita en el Ejemplo 21 y se cuantificó según el ejemplo 17b indicando que el 64% de los grupos amino había reaccionado respecto de un control de papel amino no modificado.

### Ejemplo 24

55 *Reacción de xiloglucano amino modificado (XG-NH<sub>2</sub>) adsorbido sobre la superficie de papel celulósico con anhídrido alquenil succínico (ASA) en dimetilsulfóxido (DMSO)*

Se incubó papel celulósico (Whatman n°. 1, 1,5 cm de diámetro, 15 mg) que había sido preparado en la forma descrita en el Ejemplo 20, con una solución 4 mM de ASA en DMSO (2 ml) durante la noche a temperatura ambiente en viales de cristal con agitación orbital. El papel se lavó dos veces con 10 ml 2-propanol, dos veces con 10 ml de metanol y dos veces con 10 ml de agua en el vial y finalmente se lavó con un litro de agua purificada sobre una frita. La cantidad de grupos amino detectada se redujo un 63% comparado con una muestra de control no tratada. El papel producido de esta forma se hizo reaccionar también con fluoresceína isotiocianato en la forma descrita en el Ejemplo 21 y se cuantificó según el ejemplo 17b indicando que el 63% de los grupos amino había reaccionado respecto de un control de papel amino no modificado.

65

## ES 2 280 588 T3

### Ejemplo 25

*Reacción de xiloglucano amino modificado (XG-HN<sub>2</sub>) adsorbido en la superficie de papel celulósico con anhídrido succínico en metanol (MeOH)*

5 Se incubó papel celulósico (Whatman n°. 1, 1,5 cm de diámetro, 15 mg) que había sido preparado en la forma descrita en el Ejemplo 20, con una solución 1,5 M de anhídrido succínico en MeOH anhidro (2 ml) durante la noche a temperatura ambiente en viales de cristal con agitación orbital. El papel se lavó dos veces con 10 ml de metanol, dos veces con 10 ml de agua purificada en el vial y finalmente se lavó con un litro de agua purificada sobre una frita.  
10 La cantidad de grupos amino detectada se redujo un 48% comparado con una muestra de control no tratada. El papel producido de esta forma se hizo reaccionar también con fluoresceína isotiocianato en la forma descrita en el Ejemplo 21 y se cuantificó según el ejemplo 17b indicando que el 38% de los grupos amino había reaccionado respecto de un control de papel amino no modificado.

### 15 Ejemplo 26

*Reacción xiloglucano amino modificado (XG-NH<sub>2</sub>) adsorbido sobre la superficie de papel celulósico con N-cinnamoil imidazol*

20 Se incubó papel celulósico (Whatman n°. 1, 1,5 cm de diámetro, 15 mg) que había sido preparado en la forma descrita en el Ejemplo 20, con N-cinnamoil imidazol 1M en dimetilsulfóxido (2 ml) durante la noche a temperatura ambiente en viales de cristal con agitación orbital. El papel se lavó entonces con 2-propanol (2 x 5 ml), metanol (2 x 5 ml) y un exceso de agua (1 L). La cantidad de grupos amino detectada por el ensayo cuantitativo de ninhidrina [Sarin *et al.* (1981) anal. Biochem., 117, 147-157] se redujo un 65% comparado con una muestra de control. El papel  
25 producido de esta forma se hizo reaccionar también con fluoresceína isotiocianato en la forma descrita en el Ejemplo 21 y se cuantificó según el ejemplo 17b indicando que el 84% de los grupos amino había reaccionado respecto de un control de papel amino no modificado.

### Ejemplo 27

30 *Reacción de xiloglucano amino modificado (XG-NH<sub>2</sub>) adsorbido sobre la superficie de papel celulósico con ácido bromo isobutírico*

35 Se incubó papel celulósico (Whatman n°. 1, 1,5 cm de diámetro, 15 mg) que había sido preparado en la forma descrita en el Ejemplo 20, con una solución que contenía ácido bromo isobutírico 1M y 1-etil-3-(3-dimetil amino propil) Carbo diimida en MeOH (2 ml) durante la noche a temperatura ambiente en viales de cristal con agitación orbital. El papel se lavó con metanol (2 x 10 ml) y agua ultrapura (2 x 10 ml) en el vial y finalmente se lavó con un litro de agua ultrapura sobre una frita. La cantidad de grupos amino detectada se redujo un 50% comparado con la muestra de control no tratada. El papel producido de esta forma se hizo reaccionar también con fluoresceína isotiocianato en la  
40 forma descrita en el Ejemplo 21 y se cuantificó según el ejemplo 17b indicando que el 79% de los grupos amino había reaccionado frente a un control de papel amino no modificado.

### Ejemplo 28

45 *Reacción de xiloglucano amino modificado (XG-NH<sub>2</sub>) adsorbido sobre la superficie de papel celulósico con biotin-3-sulfa-N-hidroxi succinimida éster (succinimidil biotina)*

50 Se incubó papel celulósico (Whatman n°. 1, 1,5 cm de diámetro, 15 mg) que había sido preparado en la forma descrita en el Ejemplo 20, con una solución que contenía 180  $\mu$ M de solución de succinimidil biotina en NaHCO<sub>3</sub> en 10 mM (2 ml) durante la noche a temperatura ambiente en viales con agitación orbital.

El papel se lavó entonces 4 veces con 10 ml de agua purificada en el vial y finalmente se lavó con un litro de agua purificada sobre una frita. La cantidad de grupos amino detectada se redujo un 71% comparado con una muestra de control no tratada. El papel producido de esta forma se hizo reaccionar también con fluoresceína isotiocianato en la  
55 forma descrita en el Ejemplo 21 y se cuantificó según el ejemplo 17b indicando que el 57% de los grupos amino había reaccionado frente a un control de papel amino no modificado.

El papel biotilado y una muestra de control se incubaron durante la noche con 500  $\mu$ l de una solución BSA 0,1% con agitación extremo contra extremo para bloquear la fijación de proteína no específica al papel. El papel se lavó dos  
60 veces con 1 ml de agua y se incubó con 10  $\mu$ g de conjugado de estreptavidin - alcalino fosfatasa en Tris 100 mM, pH 9,5 durante 15 minutos a temperatura ambiente. El papel se lavó 4 veces con 1 ml del mismo tampón Tris. El papel se incubó entonces con 18  $\mu$ g de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato / nitro azul (BCIPINBT) en 320  $\mu$ l de tampón Tris, pH 9,5 durante 5 minutos. El papel se lavó posteriormente 2 veces con 20  $\mu$ l de agua purificada y se secó. El papel se sometió a análisis de representación por imagen después de escanear sobre un escáner de imagen de sobremesa. El  
65 papel visiblemente azul estaba un 40% más coloreado que el papel amino no biotilado de control.

## Ejemplo 29

*Reacción de xiloglucano amino modificado (XG-NH<sub>2</sub>) adsorbido sobre la superficie de papel celulósico con  $\gamma$ -tiobutírolactona*

Se hizo reaccionar papel celulósico (Whatman n°. 1, 1,5 cm de diámetro, 15 mg) que había sido preparado en la forma descrita en el Ejemplo 20, con tiobutírolactona (87  $\mu$ l, 1 mol) en una mezcla de etanol (98%, 500  $\mu$ l) y una solución acuosa de bicarbonato sódico (0,1 M, 500  $\mu$ l) durante la noche a temperatura ambiente en viales de cristal con agitación orbital. El papel se lavó 2 veces con 5 ml de solución acuosa de bicarbonato sódico 0,1 M y finalmente con aproximadamente 1 litro de agua pura. La cantidad de grupos amino detectada se redujo un 52% comparado con la muestra de control no tratada.

La figura 9 muestra las cantidades relativas de grupos amino presentes en la superficie de papel celulósico modificado por XG-NH<sub>2</sub> después del tratamiento con diversos amino-reactivos. Las barras gris claro se refieren a la determinación por ensayo cuantitativo de ninhidrina mientras que las barras gris oscuro se refieren a la cuantificación por reacción por FITC seguido de análisis cuantitativo de imagen. La figura 10 muestra la reactividad del papel con y sin modificación por XG-NH<sub>2</sub> respecto de FITC. "Blank" es un papel de filtro comercial tratado con FITC; "XGN" es un papel de filtro comercial tratado con XG-NH<sub>2</sub> seguido de FITC; "1" es papel de filtro comercial tratado con XG-NH<sub>2</sub> seguido de anhídrido acético y luego FITC.

## Ejemplo 30

*Reacción de sulfo-rhodamina metanotiosulfonato con los grupos tiol introducidos en la superficie de papel celulósico*

La mitad del papel celulósico seco (7,7 mg) que se había producido en la forma descrita en el Ejemplo 29, se trató con 2 ml de ditiotreitól 10 mM (DTT) en solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> 0,1M bajo argón en un vial de cristal durante 2 horas con agitación ocasional, después de lavar 3 veces el papel con 2 ml de agua ultrapura desgasificada bajo argón, se añadió 1 ml de sulforhodamina metanotiosulfonato 1 mM en una solución de DMSO/H<sub>2</sub>O (1:9) y se dejó reaccionar durante 2 horas con agitación ocasional. El papel se lavó con DMSO para quitar el sulfo-rhodamina metanotiosulfonato que no había reaccionado, se lavó con agua ultrapura y se secó.

El papel mostró una coloración rosa brillante bajo luz ambiente y una fuerte fluorescencia bajo luz UV mientras que el papel en blanco tratado de la misma forma carecía de color. La mitad del papel rosa (aproximadamente 3 mg) se trató nuevamente con 500  $\mu$ l de ditiotreitól 10 mM (DTT) en una solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, para liberar el sulfa - rhodamina metano tiosulfonato unido por disulfuro de la superficie del papel. La solución sobrenadante se cuantificó por adsorción UV a 565 nm. El papel se lavó 3 veces con 1 ml de agua desgasificada bajo argón y se hizo reaccionar nuevamente con 1 ml de sulforhodamina metanotiosulfonato 1 mM en una solución de mezcla de DMSO/H<sub>2</sub>O (1:9) durante 2 horas, agitando ocasionalmente. Después de lavar con DMSO y agua, el papel volvió a mostrar una coloración rosa brillante bajo luz ambiente y una fuerte fluorescencia bajo luz UV, mientras que el papel en blanco tratado de forma idéntica carecía de color.

La figura 11 muestra el resultado de la reacción con papel tiolado con sulforhodamina metano tiosulfonato. Las muestras a la izquierda de cada fila representan papel tratado con XG-NH<sub>2</sub>, mientras que las de la derecha representan papel tratado con XG-NH<sub>2</sub>, que se hizo reaccionar ulteriormente con tiobutírolactona para introducir un grupo tio (-SH). Filas de arriba: muestras después del tratamiento con sulforhodamina metano tiosulfonato. Fila central: partes de muestras de la fila de arriba después de lavar con solución de DTT. Fila de arriba: muestras lavadas con DTT, que se hicieron reaccionar nuevamente con sulforhodamina metano tiosulfonato.

## Ejemplo 31

*Polimerización de radical con transferencia de átomo utilizando acopiador iniciador con XG en la superficie celulósica*

La polimerización de radical por transferencia atómica de superficies de papel de celulosa a temperaturas ambientes ya ha sido descrita [Carlmark and Malmström, 2002, J. Am. Chem. Soc. 124:900-901], no obstante, con cantidades elevadas de carga de iniciador, la integridad del papel queda gravemente comprometida. Realizamos la misma reacción de polimerización a partir de iniciador inmovilizado sobre la superficie celulósica por medio de xiloglucano tal como se describe en el Ejemplo 27, procedimiento que dio como resultado niveles elevados de iniciador sobre la superficie del papel sin degradación alguna de la estructura del papel. El copolímero de injerto así producido mostró un fuerte incremento en la unión de fibra-polímero comparado con las muestras de control donde el iniciador no se acopló sobre la superficie de la fibra.

Aunque la invención se ha descrito con relación a sus realizaciones preferidas, que constituyen la mejor forma actualmente conocida por los inventores, hay que entender que se pueden realizar cambios y modificaciones que se consideran obvios para el experto en la materia, sin apartarse del ámbito de la invención, que se expone en las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la modificación de material de carbohidrato polimérico (PCM), método que comprende una etapa de fijación de un grupo químico que tiene una funcionalidad deseada respecto de dicho material de carbohidrato, por medio de una molécula ligante de carbohidrato (CLM) que comprende el grupo químico y un polímero de carbohidrato soluble (SCP) que comprende una hemicelulosa, siendo dicha molécula ligante capaz de fijación al PCM.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, donde el PCM que se va a modificar se obtiene de una planta elegida dentro del grupo formado por una planta monocotiledónea y una planta dicotiledónea.
3. El método de la reivindicación 2, donde la planta monocotiledónea es una planta de la familia *Gramineae*.
- 15 4. El método de la reivindicación 2, donde la planta monocotiledónea se elige dentro del grupo formado por plantas angiospermas (maderas duras), plantas coníferas, (maderas blandas) y plantas que pertenecen a la familia de los *Gossypium*.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el PCM está en forma de fibras de plantas celulósicas.
- 20 6. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el PCM está en forma de microfibrilas celulósicas derivadas de fibras de planta celulósica o de bacteria.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el SCP es xiloglucano.
- 25 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el grupo químico que tiene una funcionalidad deseada se elige dentro del grupo formado por un grupo iónico, un grupo hidrófobo, un grupo hidrofílico sin carga, un grupo reactivo, un nucleófilo, un monómero polimerizable, un grupo cromofórico, un grupo fluorofórico, biotina, un isótopo radiactivo, un precursor de radical libre, una mitad de radical libre estable, una proteína y un agente de fijación de proteína.
- 30 9. El método de la reivindicación 8, donde el grupo químico es un grupo amino.
10. El método de la reivindicación 8, donde el grupo químico es un precursor de radical libre.
- 35 11. El método de la reivindicación 8, donde el grupo químico es una mitad de radical libre estable.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el grupo químico es un monómero para una reacción de polimerización.
- 40 13. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el grupo químico es un iniciador de polimerización de radical libre.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el material carbohidrato polimérico modificado obtenido tiene, respecto del material no modificado, propiedades superficiales alteradas.
- 45 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde el material de carbohidrato polimérico modificado obtenido tiene, respecto del material no modificado, propiedades de resistencia alteradas.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde el material de carbohidrato polimérico modificado obtenido tiene, respecto del material no modificado, propiedades de repelencia del agua alteradas.
- 50 17. Un material de carbohidrato polimérico modificado (mPCM) que se puede obtener con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, material que tiene fijados al mismo unos grupos químicos que tienen una funcionalidad deseada, siendo mediada dicha fijación por una molécula ligante de carbohidrato que comprende un grupo químico y un SCP que es una hemicelulosa, siendo dicha molécula ligante de carbohidrato capaz de fijarse al PCM.
- 55 18. El material de la reivindicación 17, que se encuentra en forma de fibras de planta celulósica o microfibrilas celulósicas derivadas de fibras de planta celulósica o de una bacteria.
- 60 19. El material de la reivindicación 17 o 18, donde los grupos químicos son grupos reactivos capaces de fijar otros grupos funcionales.
20. El material de cualquiera de las reivindicaciones 17-19, al que van unidos dos o más tipos diferentes de grupos químicos.
- 65 21. El material según cualquiera de las reivindicaciones 17-20, donde el grupo químico se elige dentro del grupo formado por un precursor de radical libre, una mitad de radical libre estable, un monómero para una reacción de polimerización y un iniciador de polimerización de radical libre.

## ES 2 280 588 T3

22. Un material compuesto que comprende el material de cualquiera de las reivindicaciones 17-21.

23. Un material de polímero injertado a base de celulosa que se puede obtener por reacción de polimerización de un material de la reivindicación 22.

5 24. Utilización del material de cualquiera de las reivindicaciones 17-23, en la fabricación de productos de papel y de cartón.

10 25. Utilización del material de cualquiera de las reivindicaciones 17-23, como agente auxiliar en un ensayo o proceso de diagnóstico o químico.

15 26. Utilización del material polímero injertado a base de celulosa de la reivindicación 23, en la fabricación de hojas de papel, cartón ondulado, tejidos, agentes auxiliares en un ensayo o proceso de diagnóstico o químico, agentes de envasado para líquidos o alimentos, papel y cartones, textiles, papeles de seguridad, billetes de banco, agentes de relleno para documentos rastreables, laminados, productos de panel, compuestos de madera - polímero, compuestos de polímero, aleaciones y mezclas o derivados celulósicos (celulosas).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 2

Bond cleavage: Segmentación de enlace

Resynthesis: Resíntesis

FIGURA 5

XG-FITC produced (mg): XG-FITC producido (mg)

Time (min): tiempo (min).

FIGURA 6

XG-FITC produced (mg): XG-FITC producido (mg)

Enzyme (units): Enzima (unidades).

FIGURA 9

Amino paper: Papel amino

Acetic anhydride: anhídrido acético

Phenylisothiocyanate: Fenilisotiocianato

Alkenyl succinic anhydride: Anhídrido alquenil succínico

N-cinnamoyl imidazole: N-cinnamoil imidazol

Bromo isobutyric acid: ácido bromo isobutírico

Succinimidyl biotin: Succinimidil biotina

Succinic acid anhydride: Anhídrido succínico

Thiobuturylactone: Tiobuturilactona

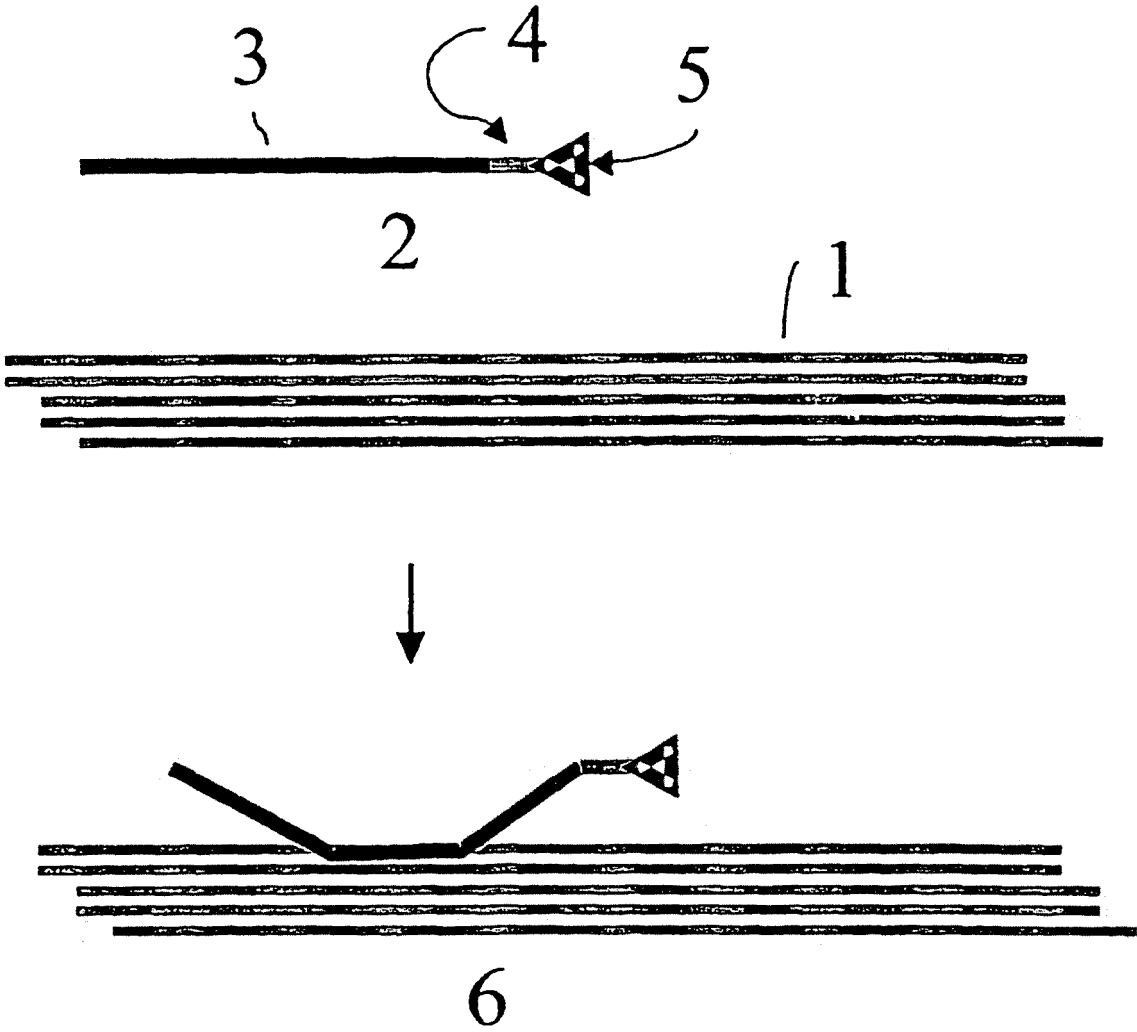


Fig. 1

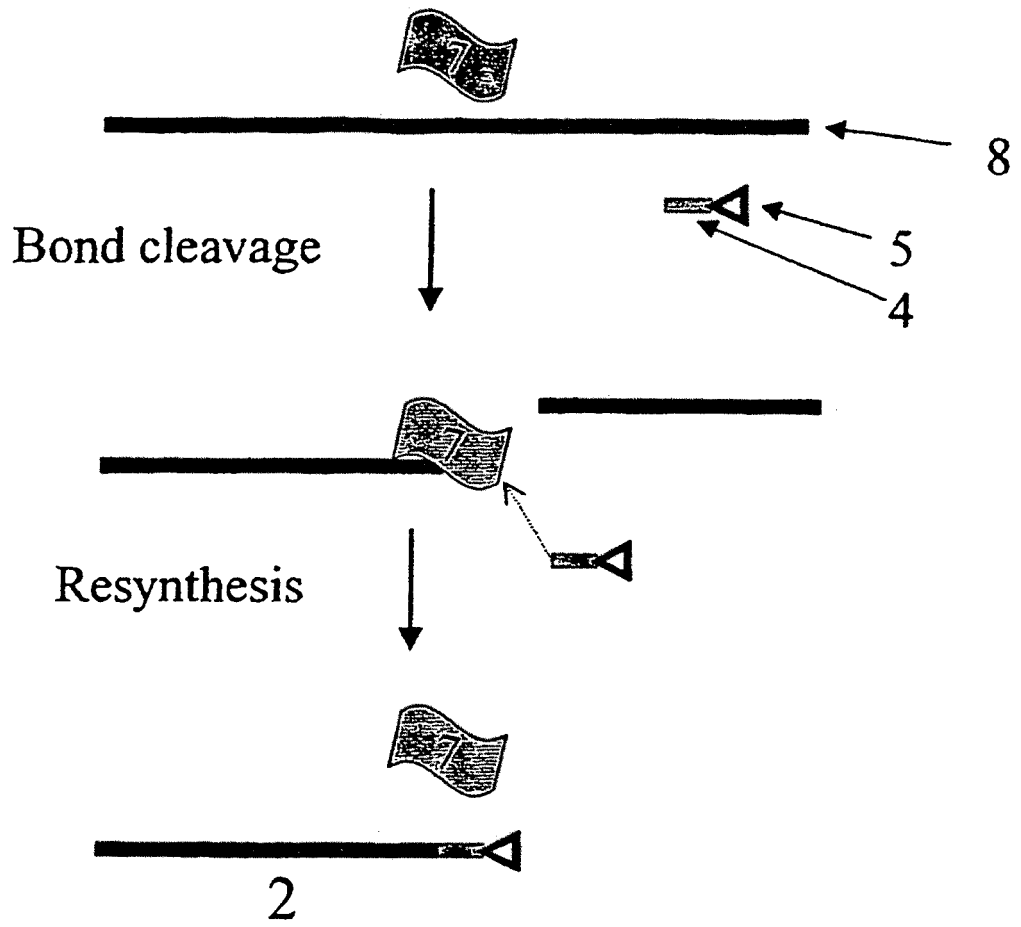


Fig. 2

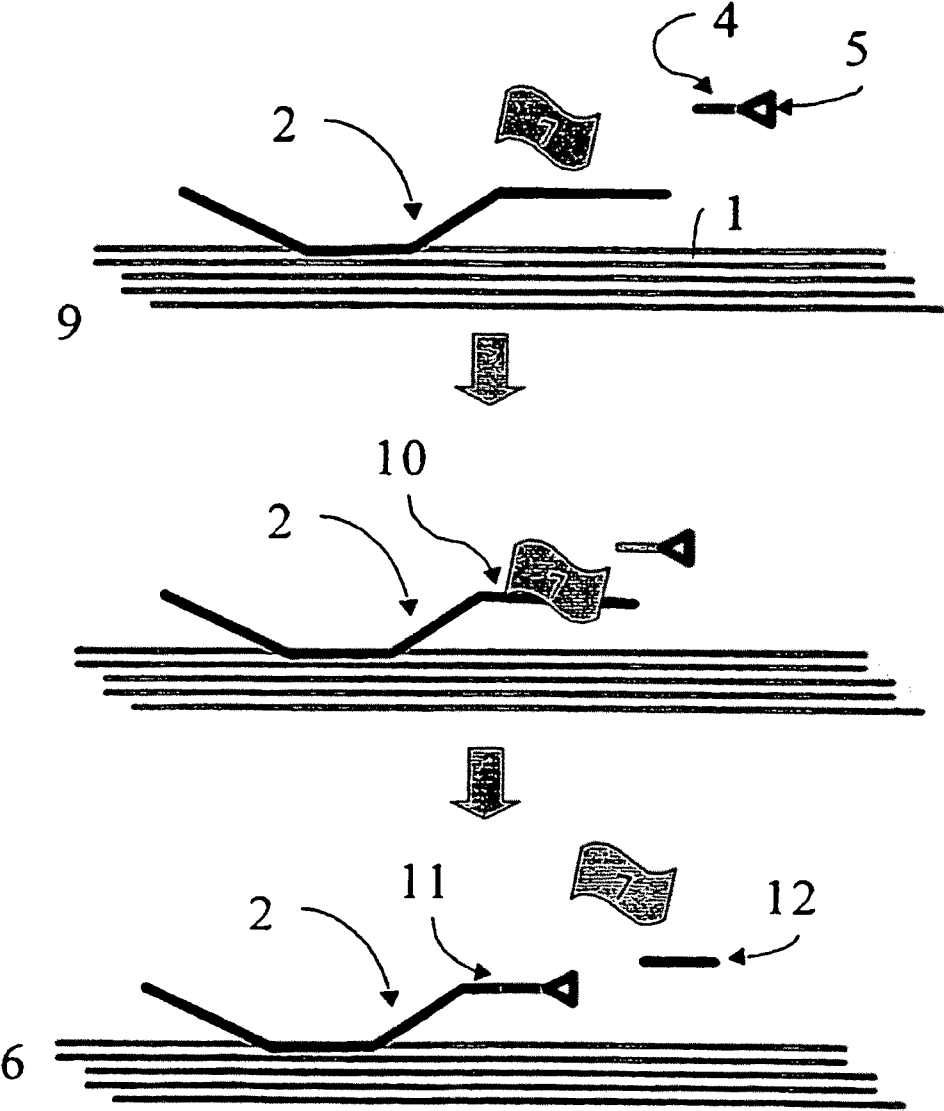


Fig. 3

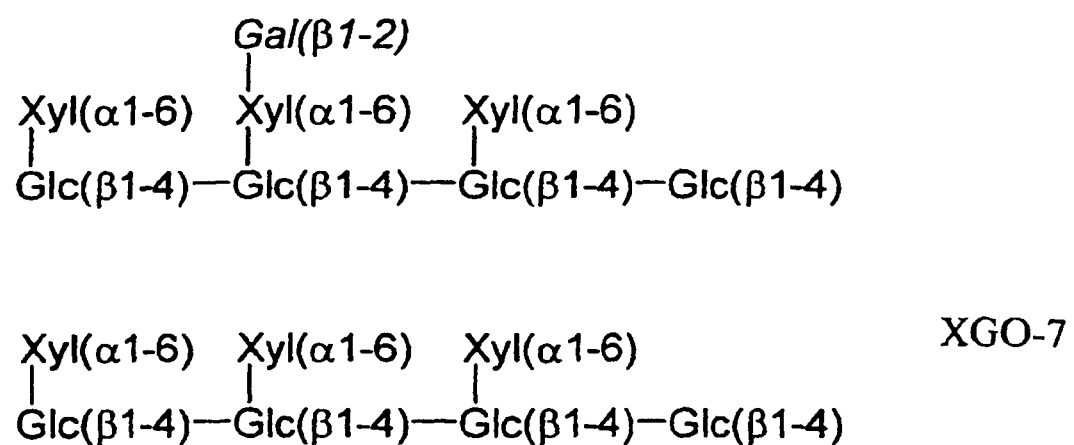
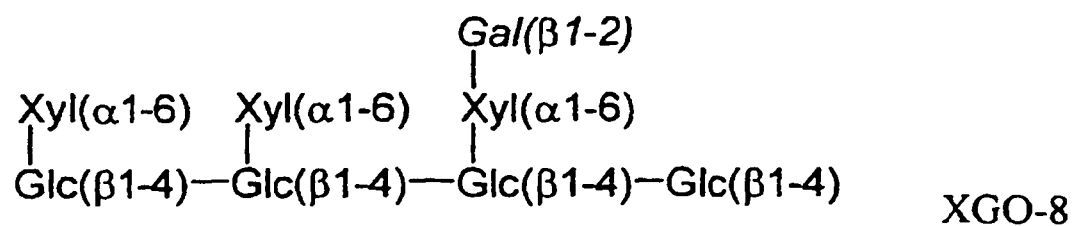
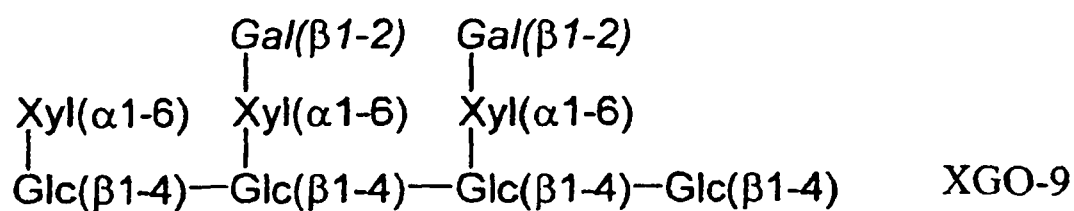


Fig. 4

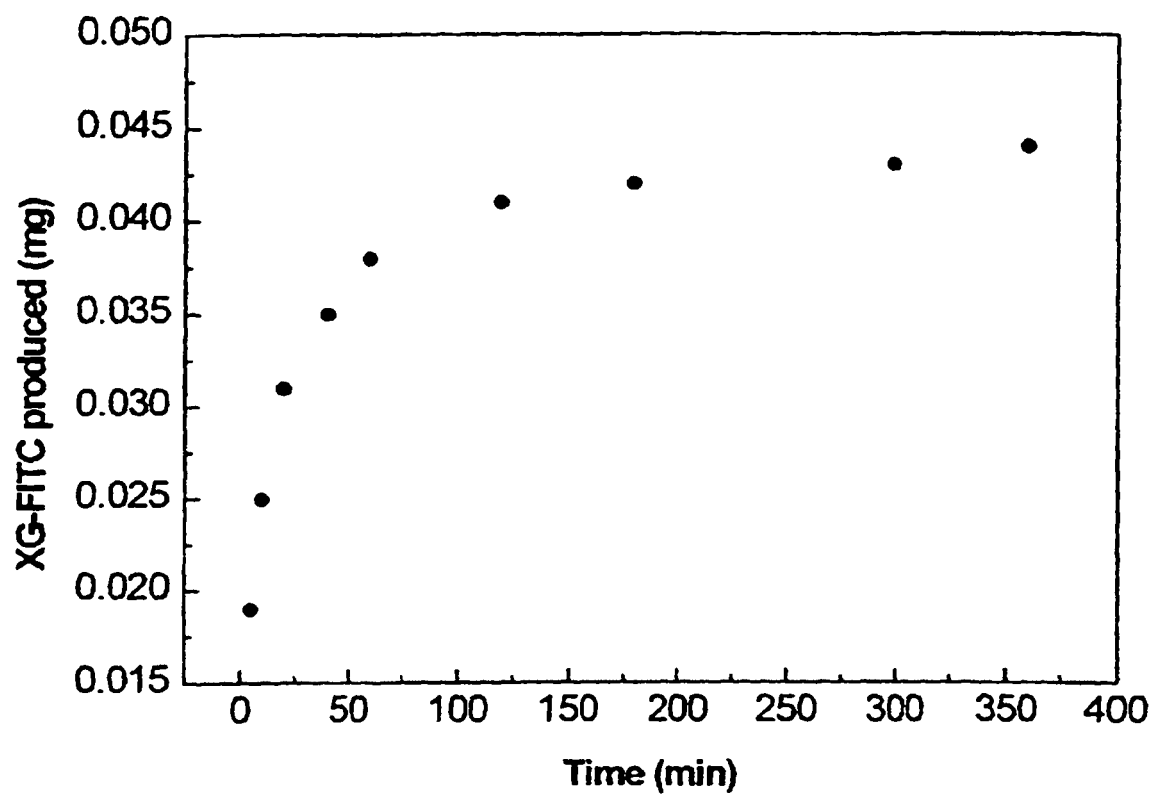


Fig. 5

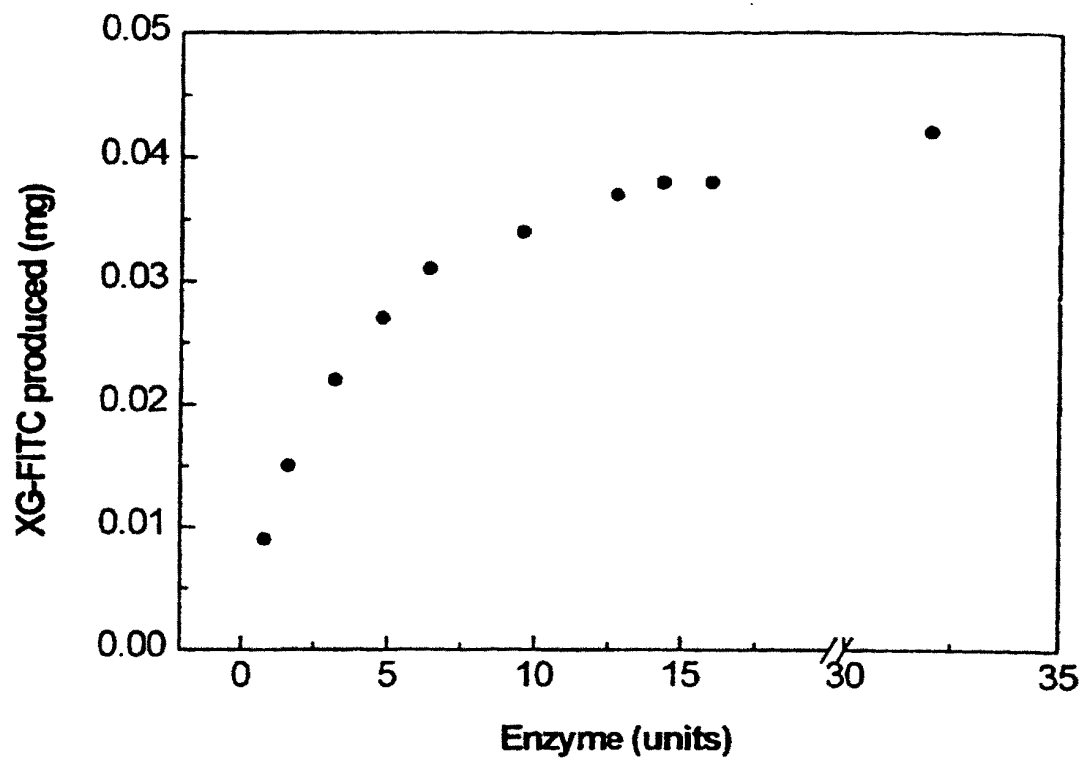


Fig. 6

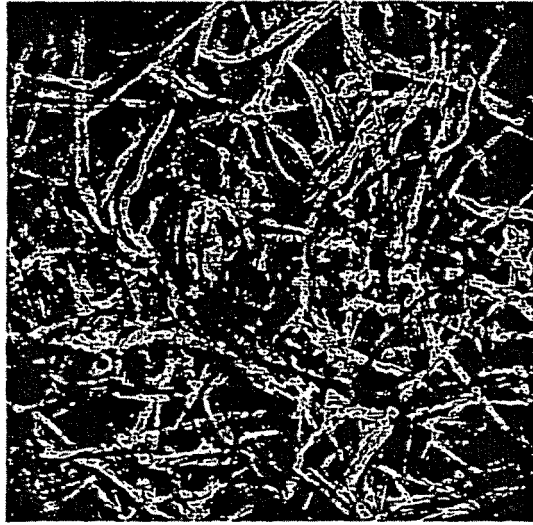


Fig. 7

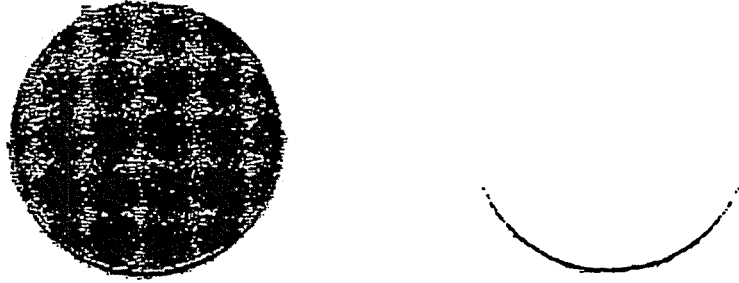


Fig. 8

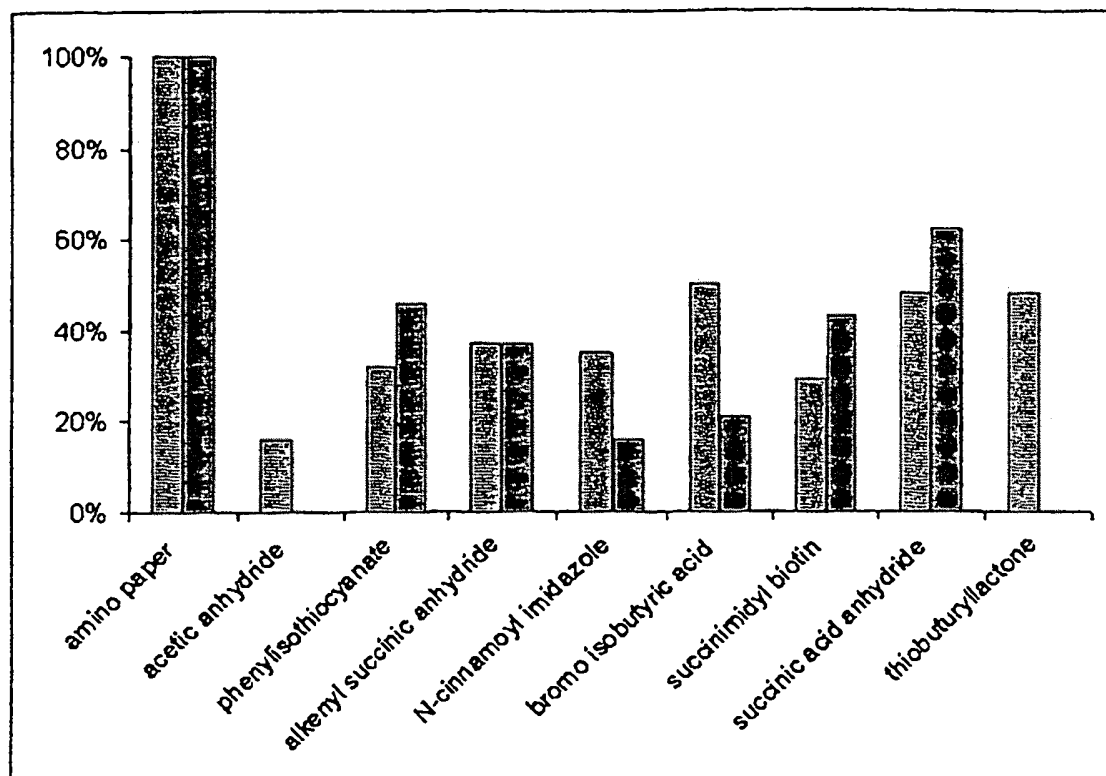


Fig. 9

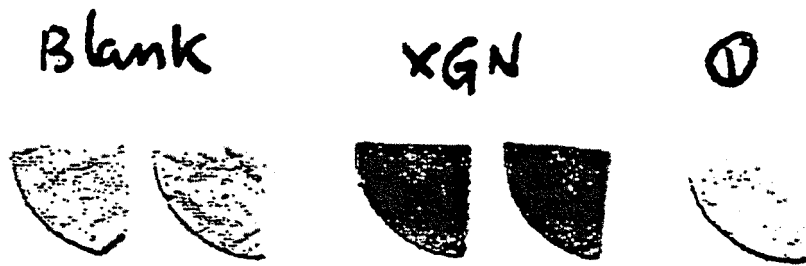


Fig. 10



Fig. 11

# ES 2 280 588 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> SWEETREEGENOMICS AB TEERI, Tuula T. BRUMER, Harry

<120> Método enzimática para la modificación de materiales de carbohidrato polimérico.

<130> MH 47344

<160> 3

<170> Patente en versión 3.1

10

atggctggtt cttcaactcc gtgggctctc gtagctctgt ttctgatggc ctcttcta  
ct 60

15

gtaatggcaa ttctccacg gaaagccatt gatgtgcat tcggccgaaa ctacgtcc  
ca 120

20

acttgggctt ttgaccacca gaagcaactc aatggcgggt ccgaactcca actcatcc  
tc 180

gacaaataca ctgggacagg gtttcaatcg aaagggtcgt atttgttcgg acatttca  
gt 240

25

atgcacataa agctgccagc tggtgatacc gctggggtcg tcaactgcatt ttatctgt  
cg 300

30

tcgactaaca acgagcatga cgagatagat ttcgagtttc tcgggaacag gacaggcc  
ag 360

ccagtaatat tgcagaccaa tgtattcaca ggaggaaagg gaaacagaga gcaacgca  
tc 420

35

tatctctggt tcgaccttc aaaggcttat catacttact ccgtcctctg gaatctct  
ac 480

40

caaattgtat tctttgttga caacatacca atccgtgtgt tcaagaacgc taaggatc

45

50

55

60

65

ES 2 280 588 T3

ta 540

5 ggagtacggt tcccattcaa ccaaccgatg aagctatact cgagcctttg gaacgctg  
ac 600

10 gattgggcca cgagaggagg gctagagaaa accaattggg ctaatgcacc cttcatag  
ct 660

15 tcctacagag gattccacat cgacggctgc caagcttctg tggaggccaa gtactgtg  
ct 720

20 acccaaggcc gcatgtggtg ggatcagaat gagttccgtg atcttgatgc cgaacaat  
at 780

25 cgtcgcctca aatgggtccg catgaaatgg accatctaca actactgtac cgaccgta  
ca 840

30 aggttcccag ttatgccagc cgaatgtaga agggacagag acgtg  
885

35 atggctgttt cagtctttaa gatgggtgggt ttctttgttg gtttctttct aattgtgg  
gt 60

40 ttggttagtt cagctaagtt tgacgagctc tttcaaccaa gttgggctct tgatcaet  
tt 120

45 gcttatgaag gagagcttct caggctcaag cttgataatt attctggtgc tggatttc  
aa 180

50 tccaaaagca agtatatggt tggaaaagta acagtacaaa taaagcttgt agaggggtg  
at 240

55 tctgctggaa ctgttactgc tttctatatg tcatctgagg gtccatacca caacgagt  
tt 300

60 gattttgagt ttcttggeaa caccacagga gaaccttact tggttcaaac caatgtat  
tt 360

65 gttaatggcg taggtcacia agaacaaga ctgaaccttt ggtttgacce taccaagg

55

60

65

ES 2 280 588 T3

at 420

5 ttccattctt actccttact ttggaaccag cgccaagttg tgtttctagt ggacgaga  
cc 480

10 ccaattagat tgcataccaa tatggaaaac aaaggaatc cttttccaaa ggaccaag  
cc 540

atgggtgat acagctcaat atggaatgca gatgattggg ctacacaagg tggccgtg  
tc 600

15 aagactgatt ggagtcatgc accctttggt gcctcctata aaggatttga aattgatg  
cg 660

20 tgtgagtgtc cagtatcagt agctgcagct gataatgcta agaaatgtag cagcagtg  
gt 720

25 gagaaaaggt actggtggga tgaacctacg ttgtctgagc tcaatgcgca ccagagcc  
at 780

cagcttttgt gggatgaaggc taaccacatg gtctacgact actgcagcga cactgcta  
gg 840

30 tccccagtca ctcctctaga gtgcctgcac cacagccacc gccaccac  
888

35

atggctgctg cttatccgtg gactttgttt cttggcatgc tggttatggt atctggaa  
ca 60

40

atgggagctg ccctgaggaa gccagtggat gtggcgttcg gtaggaacta tgttccta  
ca 120

45

tgggcttttg accacattaa gtacttcaat ggaggcaatg agattcagct gcaettgg  
at 180

50

aaatacacag gtactggttt ccaatcaaaa ggttcatact tatttggcca tttcagta  
tg 240

caaatgaagt tggttcctgg tgactcagct ggaacagtca ctgctttcta tctatcct

55

60

65

ES 2 280 588 T3

ca 300

5 caaaactcgg agcatgacga gatagacttt gagttcttag gaaacaggac tggccagc  
cc 360

10 tacattttgc agacaaatgt tttcacagga ggcaaggggg atagagaaca gaggattt  
ac 420

15 ctctggtttg acccaaccaa ggaattccac tactattctg tcctctggaa catgtaca  
tg 480

20 atagtgttcc tcgtggatga cgtgccaatc agagtgttca agaactgcaa agatttgg  
ga 540

25 gttaagtttc cattcaacca gccaatgaag atctactcaa gcctatggaa tgccgatg  
at 600

30 tgggctacca ggggtggact cgagaagaca gactgggtcca aggcaccggt cattgect  
cc 660

35 tacaggagct tccacataga tgggtgcgag gcctccgtgg aagccaagtt ctgcgcca  
ca 720

40 cagggtgcta gatggtggga ccagaaggag ttccaagatc tggatgcect ccagtaca  
gg 780

45 aggctcagct ggggtccgcca gaaatatacc atctacaatt actgcactga tagatcaa  
ga 840

50 tacccttcaa tgccccaga atgcaagaga gacagagaca ta  
882

40

45

50

55

60

65