



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 260 444**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/34 (2006.01)
C12P 19/12 (2006.01)
C07H 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02740774 .1**
86 Fecha de presentación : **14.06.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1408118**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2004**

54 Título: **Un procedimiento enzimático para obtener 4-O-β-D-galactopiranosil-D-xilosa, 4-O-β-D-galactopiranosil-D-xilosa obtenida de acuerdo con el procedimiento, composiciones que la contienen y su uso en la evaluación de la lactasa intestinal.**

30 Prioridad: **18.06.2001 ES 200101419**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2006

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2006

73 Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 113
28006 Madrid, ES
Universidad Autónoma de Madrid**

72 Inventor/es: **Canada Vicinay, Francisco, Javier;
Corrales Morales, G.;
Fernández-Mayoralas Álvarez, A.;
Martín Lomas, Manuel y
Aragón Reyes, Juan José**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 260 444 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

Un procedimiento enzimático para obtener 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa, 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa obtenida de acuerdo con el procedimiento, composiciones que la contienen y su uso en la evaluación de la lactasa intestinal.

La presente invención está comprendida en el campo de los procedimientos para obtener compuestos, concretamente disacáridos útiles en los métodos de evaluación in *cruentos* de la actividad lactasa intestinal.

10 **Antecedentes de la invención**

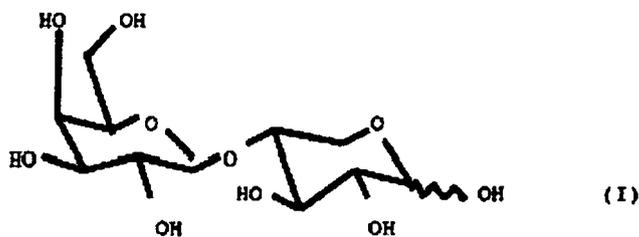
La deficiencia o baja actividad en lactasa intestinal que resulta en una capacidad insuficiente o hasta nula para digerir lactosa, es rara como error metabólico congénito, pero es un síndrome común en humanos adultos. Sin embargo, en la mayor parte de los mamíferos existe una acusada disminución de la actividad lactasa desde el momento del destete. En humanos cuyos antepasados hayan dependido de un consumo sustancial de leche o productos lácteos durante largo tiempo, esta disminución es menos frecuente. Por otra parte, en lactantes es bastante infrecuente la deficiente o baja actividad en lactasa intestinal.

La determinación de la actividad lactasa intestinal es de importancia en pediatría y gastroenterología y puede llevarse a cabo directamente, a partir de una muestra de mucosa, o indirectamente, a partir del nivel de glucosa en sangre o del hidrógeno espirado, después de administrar una dosis de lactasa al individuo.

La determinación directa tiene la desventaja de constituir un método complejo y caro debido al hecho de que requiere instrumental específico y personal muy especializado para extraer la muestra que debería someterse a análisis posteriormente, a parte del hecho de resultar desagradable y no carente de peligro para el individuo.

Otros métodos de determinación de la lactasa intestinal se basan en el hecho de que algunos disacáridos son, en base a su afinidad por la lactasa, capaces de actuar como sustrato de la lactasa y se transforman, por acción de la enzima, en determinados monosacáridos que son absorbidos fácilmente por el intestino y eliminados por la orina.

En la patente española ES-P-9001680 se describe la preparación del disacárido 4-O- β -galactopiranosil-D-xilosa de la fórmula (I)

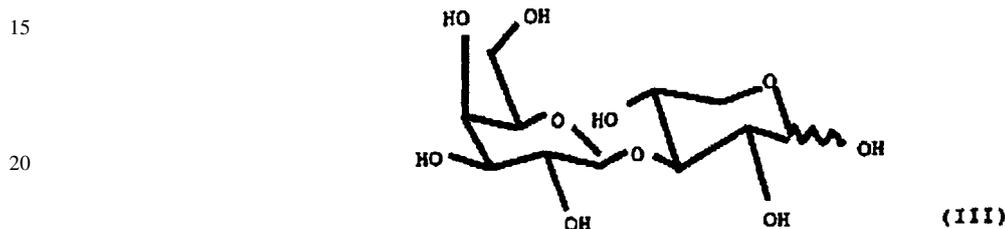
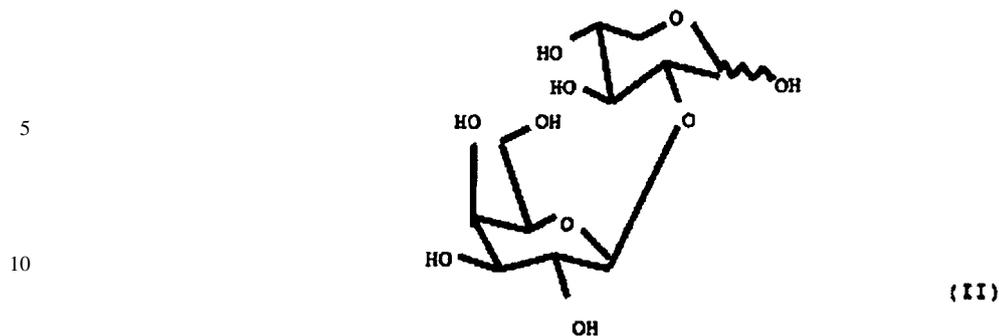


para la evaluación de la actividad lactasa intestinal. Dicho disacárido se administra oralmente, actúa como sustrato de la lactasa intestinal y por tanto se descompone, en el tracto intestinal, en xilosa y galactosa, siendo absorbida la xilosa y excretada por la orina con lo que la xilosa puede evaluarse directamente mediante un método colorimétrico simple.

Las cantidades de xilosa excretadas en orina están correlacionadas con los niveles de lactasa intestinal.

La patente española ES-P-9001680 también describe un método de preparación básicamente de la 4-O- β -galactopiranosil-D-xilosa, que comprende una síntesis de bencil β -D-xilopiranosido y a la que sigue una secuencia de operaciones que implica reacciones de protección selectiva, glicosilación y desprotección. Tanto el número de etapas de reacción, como la utilización de reactivos caros tales como el triflato de plata en la reacción de glicosilación, y el empleo de columnas de cromatografía en la purificación de intermedios y del producto final, producen costes y presentan dificultades para llevar a cabo este procedimiento a escala industrial.

Las patentes españolas ES-P-9502185 y ES-P-9701156 describen procedimientos enzimáticos para la preparación de mezclas de disacáridos galactopiranosil-xilosas que contienen el disacárido (I) y sus regioisómeros 2-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa y 3-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa que, respectivamente, presentan las siguientes fórmulas



25 Los procedimientos descritos en las patentes españolas ES-P-9502185 y ES-P-9701156 permiten obtener en una sola etapa de reacción y tras purificación cromatográfica, mezclas de 2-, 3- y 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa útiles como sustratos y, por tanto, para la determinación de la actividad enzimática de la lactasa intestinal. Dichos procedimientos, aunque viables a partir de sustratos y enzimas asequibles, presentan dificultades, desde el punto de vista de la síntesis industrial, en cuanto a la caracterización de las proporciones más adecuadas, la reproducibilidad de la
30 preparación en dichas proporciones y la determinación de posibles impurezas.

35 Por otra parte, Gorin *et al.* en "The Synthesis of β -Galacto- And β -Gluco-Pyranosyl Disaccharides by *Sporobolomyces Singularis*", Can. J. Chem. 42(1964) 2307-2319, describen la síntesis de una pluralidad de disacáridos, entre ellos 2-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa y la 3-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa, mediante un procedimiento utilizando células. En esta publicación no se describe ningún uso de los diferentes disacáridos sintetizados. Sin embargo, Aragón *et al.* en "Evaluation of rat intestinal lactase *in vivo* with 4-galactosylxylose" propone el uso del disacárido antes mencionado para evaluar la actividad lactasa intestinal.

Objeto de la invención

40 Es un primer objeto de la presente invención superar los inconvenientes del estado de la técnica anteriormente citados.

45 Es otro objeto de la invención, proporcionar un procedimiento mejorado que implique cualquier reacción enzimática entre D-xilosa y un sustrato β -D-galactopiranosido y una posterior fase de aislamiento y purificación, que permite aumentar la proporción de 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa en la mezcla final de la reacción enzimática frente a los disacáridos 2- y 3-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa, a partir de cuya mezcla final puede aislarse la 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa mediante operaciones simples.

50 La 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa que puede obtenerse mediante el procedimiento anteriormente mencionado, así como las composiciones que comprenden dicha 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa, constituyen ulteriores objetos de la invención.

55 Es otro objeto de la invención usar la 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa en la preparación de composiciones y disoluciones útiles en la evaluación *in vivo* de la actividad lactasa intestinal.

Descripción de la invención

60 Los objetos anteriormente mencionados se consiguen de acuerdo con la presente invención, mediante un procedimiento enzimático para obtener 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa que comprende

una primera etapa de preparación de una primera mezcla de reacción de

2-20% en peso de D-xilosa

65 0,5-5% en peso de un sustrato β -D-galactopiranosido

75-97,5% en peso de un medio de reacción que comprende agua taponada a un pH entre 5,0 y 9,0;

ES 2 260 444 T3

añadiéndose de 10 a 1.000 unidades de una enzima β -D-galactosidasa, por gramo de β -D-galactopiranosido, a la primera mezcla de reacción; y obteniéndose una segunda mezcla de reacción;

5 una segunda etapa en la que la segunda mezcla de reacción se somete a una reacción a una temperatura comprendida entre una temperatura superior al punto de congelación de la segunda mezcla de reacción y 45°C, durante 2 a 48 horas, para formar disacáridos en la segunda mezcla de reacción;

10 una tercera etapa en la que se para la reacción cuando se han formado los disacáridos en la cantidad deseada, mediante un tratamiento elegido entre desactivación de la β -D-galactosidasa por congelación de la segunda mezcla de reacción a una temperatura entre -20°C y -170°C, desactivación de la β -D-galactosidasa por calentamiento de la segunda mezcla de reacción a una temperatura entre 95 y 110°C, y separación de la β -D-galactosidasa de la segunda mezcla de reacción por ultrafiltración; obteniéndose una tercera mezcla de reacción;

15 una cuarta etapa en la que se separa de la tercera mezcla de reacción, mediante extracción o filtración, un fragmento aglicónico del sustrato β -D-galactopiranosido usado en la primera etapa; obteniéndose una cuarta mezcla de reacción;

una quinta etapa que comprende el aislamiento de fracciones que contienen 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa, seleccionada entre

20 adición de celita a la cuarta mezcla de reacción, seguida de extracción sólido-líquido con un disolvente y elución con un primer eluyente en una columna;

y adición directa de carbón activo a la cuarta mezcla de reacción seguida de filtración y elución con un segundo eluyente,

25 y una sexta etapa, en la que las fracciones que contienen 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa se cristalizan en una mezcla de cristalización seleccionada entre mezclas de acetona/metanol en una relación entre 5/1 y 20/1, y mezclas de acetona/agua en una relación entre 5/1 y 20/1.

30 De acuerdo con la invención, la proporción de D-xilosa en la segunda mezcla de reacción es preferentemente de 7,5% en peso, la proporción del β -D-galactopiranosido en la segunda mezcla de reacción es de 1,5% en peso, y se añaden 100 unidades de β -D-galactosidasa por gramo de β -D-galactopiranosido.

35 Opcionalmente, el medio de reacción puede comprender además al menos un medio codisolvente seleccionado entre dimetilsulfóxido, dimetilformamida, dioxano y mezclas de los mismos, preferentemente en una proporción del 20,5 referida al medio de reacción. En una realización de la invención, el medio de reacción está taponado a pH 7.

40 La reacción convenientemente se lleva a cabo a temperatura constante, a fin de aumentar su reproducibilidad. En una realización del procedimiento de la invención, la temperatura de reacción es superior al punto de congelación de la segunda mezcla de reacción e inferior a 40°C. En otra realización, la reacción se realiza a temperatura ambiente, lo cual permite buenos rendimientos sin necesidad de enfriar la segunda mezcla de reacción. La reacción también puede realizarse a -5°C, o a 37°C. La temperatura de reacción es preferentemente inferior a 0°C pero superior al punto de congelación de la segunda mezcla de reacción.

45 De acuerdo con la invención, el sustrato β -D-galactopiranosido preferentemente se selecciona entre o-nitrofenil β -D-galactopiranosido (Gal-ONP) y lactosa. La enzima β -galactosidasa puede ser β -galactosidasa de *E. coli* o de *Kluyveromyces lactis* (como por ejemplo MAXILACT®). Cuando se usa Gal-ONP como sustrato se forma en la reacción o-nitrofenol que se elimina por extracción con acetato de etilo en el caso de que la reacción se pare por calentamiento, o bien se elimina por simple filtración en el caso de que la reacción se pare por enfriamiento.

50 Cuando, en la tercera etapa del procedimiento la reacción se para mediante congelación de la segunda mezcla de reacción, se aplica preferentemente una temperatura de -78°C. Por otra parte, cuando en la tercera etapa la reacción se para mediante calentamiento de la segunda mezcla de reacción, se aplica preferentemente una temperatura de 100°C.

55 En la quinta etapa, la 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa puede aislarse de la mezcla de reacción, mediante varios métodos alternativos.

60 Según un primer método alternativo, se elimina el agua de la cuarta mezcla de reacción para obtener un residuo de reacción que contiene los disacáridos, se somete el residuo de reacción a un tratamiento de acetilación para obtener un derivado peracetilado de 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa, y a una separación del derivado peracetilado en columna cromatográfica en gel de sílice. La acetilación del residuo de reacción se realiza preferentemente con anhídrido acético en piridina, mientras que la desacetilación del derivado peracetilado se realiza catalíticamente con metóxido sódico en metanol.

65 Según un segundo método alternativo, la cuarta mezcla de reacción se somete a elución en columna con un primer eluyente que puede seleccionarse entre mezclas de agua con metanol, etanol o isopropanol, preferentemente una mezcla de agua/isopropanol con una proporción de isopropanol de 1 a 10% (v/v), preferentemente del 2% (v/v).

ES 2 260 444 T3

La elución se lleva a cabo en una columna de filtración seleccionada entre columnas de filtración con rellenos de polímeros de dextranos entrecruzados, como por ejemplo una columna con relleno de SEPHADEX, columnas de filtración con rellenos de polímeros de acrilamida, como por ejemplo, una columna con relleno de BIOGEL, y columnas de filtración de carbón activo o de carbón activo-celita, para obtener fracciones que contienen 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa.

Preferentemente, la cuarta mezcla de reacción se concentra antes de someterse a la elución en la columna. Según un tercer método alternativo, se adiciona celita a la cuarta mezcla de reacción, se concentra hasta sequedad la mezcla así obtenida y se somete el residuo a una extracción sólido-líquido con un disolvente orgánico en un extractor "Soxhlet" seguida de elución en una columna. El disolvente preferido para la extracción sólido-líquido es acetato de etilo. La columna está seleccionada entre columnas de filtración con rellenos de polímeros de dextranos entrecruzados, como por ejemplo una columna con relleno de SEPHADEX, columnas de filtración con rellenos de polímeros de acrilamida, como por ejemplo una columna con relleno de BIOGEL, y columnas de filtración de carbón activo o de carbón activo-celita. Preferentemente la columna es de carbón activo-celita, en la que se desactiva el carbón mediante adición de ácido clorhídrico.

Este tercer método alternativo ofrece la ventaja de eliminar la mayor parte de la xilosa -sobre todo cuando se usa en gran exceso en la reacción- antes de la elución en la columna con lo cual el relleno, así como la cantidad de primer eluyente que se necesita para la elución es mucho menor. Otra ventaja de este tercer método alternativo es que la extracción sólido-líquido en acetato de etilo es completamente selectiva puesto que en la fase líquida no se observa presencia de disacáridos, sino únicamente de xilosa y galactosa.

Según un cuarto método alternativo, la elución en la quinta etapa se realiza, en lugar de utilizando una columna de relleno, adicionando carbón activo a la cuarta mezcla de reacción una vez separado el fragmento aglicónico del sustrato en la cuarta etapa, consiguiendo así que la 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa, se absorba sobre el carbón activo y eluyendo la 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa del carbón activo con un segundo eluyente. Dicha elución se lleva a cabo preferentemente mediante lavados consecutivos con agua y con isopropanol diluido con una proporción creciente en volumen de isopropanol en etapas sucesivas. La proporción en volumen de isopropanol está comprendida entre 1% y 3% en una primera etapa, entre 3% y 5% en una segunda etapa, y entre 5% y 7% en una tercera etapa. La concentración de isopropanol preferida para el lavado es una secuencia de isopropanol al 2%, seguida de elución con isopropanol al 4% y seguida de elución con isopropanol al 6%. Del residuo obtenido por concentración, se obtiene la 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa pura cristalizándola en acetona-agua.

Preferentemente, según este cuarto método alternativo se usa o-nitrofenil β -D-galactopiranosido como sustrato para la reacción.

Según este cuarto método alternativo se obtienen múltiples ventajas tales como el hecho de que no es necesario calentar la segunda mezcla de reacción a 100°C para detener la reacción, ni tampoco separar el fragmento aglicónico del sustrato en la cuarta etapa mediante extracción. De igual modo, se evita la necesidad de concentrar la cuarta mezcla de reacción, con lo que no se produce caramelización de la misma. Se reduce la cantidad de carbón activo que se necesitaría para el relleno de una columna, se reduce también la cantidad total de eluyentes, y se evita el uso de celita.

De acuerdo con la invención según la sexta etapa se cristalizan las fracciones que contienen 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa obtenidas en una mezcla de cristalización seleccionada entre mezclas de acetona/metanol en una relación entre 5/1 y 20/1, y mezclas de acetona/agua en una relación entre 5/1 y 20/1, preferentemente una relación de 10/1.

La invención también se refiere a 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa obtenida mediante el método anteriormente descrito, y a composiciones y soluciones salinas o acuosas, que comprenden una 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa obtenida mediante dicho procedimiento, así como al uso de una 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa en la preparación de composiciones y soluciones para la evaluación *in vivo* de lactasa intestinal en humanos.

En tales composiciones y disoluciones, la β -D-galactopiranosil-D-xilosa se combina con cantidades farmacéuticamente aceptables de al menos un aditivo seleccionado entre estabilizantes, agentes protectores, agentes aromatizantes, lactosa, agentes gelificantes, agentes fluidificantes y conservantes, farmacéuticamente aceptables y en sí convencionales.

La 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa o las composiciones o soluciones que la contienen, se administran por vía oral y conducen a la aparición en orina de xilosa que, valorada espectrofotométricamente, se utiliza de manera específica, rutinaria, incruenta y sencilla para la evaluación diagnóstica de las deficiencias en actividad lactasa.

Realizaciones de la invención

La invención se describirá ahora en base a unos ejemplos que ilustrarán con más detalle algunas de las características anteriormente descritas.

ES 2 260 444 T3

Ejemplo 1

Para determinar la influencia de la temperatura de reacción se realizó el siguiente ensayo:

5 Se prepararon muestras de mezclas de reacción compuestas por

125 mg (500 mM) de D-xilosa

25 mg (50 mM) de o-nitrofenil β -D-galactopiranosido

10

1,75 ml de un medio de reacción compuesto

por una solución acuosa tamponada a pH 7 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,05 M, MgCl_2 1 mM, mercaptoetanol 5 mM),

15

a las que se añadieron unidades de enzima β -galactosidasa de *E. coli* en función de las temperaturas de reacción aplicadas, de acuerdo con la siguiente tabla:

20

temperatura de reacción (°C)	unidades de enzima añadidas (u)
45	1,6
37	1,6
25	1,6
5	10
-5	20

30

Los incrementos en la cantidad de enzima fueron necesarios para compensar la ralentización que se produce en la reacción por el descenso de la temperatura de reacción. Cabe indicar que es posible trabajar a temperaturas por debajo del punto de congelación del agua gracias al descenso crioscópico que se produce en el medio de reacción debido a la alta concentración de azúcar en las muestras.

35

Se determinó, para cada una de las muestras y para cada etapa del procedimiento, la relación entre 4-, 2- y 3-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa, por cromatografía de gases con un cromatógrafo equipado con detector de ionización de llama y columna capilar SE-54 de 15 m de longitud, 0,15 mm de diámetro interno y 0,3 μm de espesor. Se empleó un flujo de nitrógeno de 1 ml/min. El programa de temperaturas utilizado era:

40

Temperatura inicial: 160°C
Tiempo inicial: 2 min
Incremento de temperatura: 5°C/min
Temperatura final: 250°C

45

50 Las muestras se analizaron después de trimetilsililación mediante el siguiente protocolo:

Una alícuota (10 μl) se congeló a -170°C y se liofilizó hasta obtener un residuo seco, tras lo cual se añadió, al residuo seco, piridina (25 μl) que contenía como referencia interna bencil β -D-xilopiranosido (10 mM) y N-trimetilsilimidazol (25 μl), y se mantuvo el calentamiento a 60°C durante 30 minutos. Los tiempos de retención de los picos asignables a los distintos disacáridos fueron los siguientes:

55

Bencil β -D-xilopiranosido: 12,04 min
2-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa: 18,46 y 19,50 min
3-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa: 18,30 min
4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa: 20,35 y 20,50 min

60

65 La siguiente tabla refleja las proporciones tomadas en el máximo de formación de disacáridos, de 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa (=compuesto I) frente a la suma de sus regioisómeros 2- y 3-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa que se obtuvieron:

ES 2 260 444 T3

TABLA 1

Temperatura	Tiempo aproximado de reacción (minutos)	relación compuesto I / compuestos II + III
45	90	68:32
37	150	71:29
25	180	79:21
5	270	80:20
-5	120	83:17

De la anterior tabla se desprende que a medida que se bajaba la temperatura, se produjo un aumento en la proporción de 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa.

Ejemplo 2

Para determinar la influencia del pH en la reacción, se prepararon las siguientes muestras:

Gal-ONP (50 mM):	25 mg
D-xilosa (500 mM):	125 mg
Galactosidasa de <i>E. coli</i> :	1,6 u
solución acuosa tamponada	
(fosfato potásico 50 mM, 1 mM MgCl ₂ ,	
5 mM mercaptoetanol) a pH:	
8,5	1,6 ml,
7	1,6 ml,
5	1,6 ml

y se hicieron reaccionar a 37°C.

El progreso de la reacción se siguió del mismo modo que se describe en el ejemplo 1.

La siguiente tabla refleja las proporciones de 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa (=compuesto I) frente a la suma de sus regioisómeros 2- y 3-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa que se obtuvieron:

TABLA 2

pH	Tiempo aproximado de reacción (minutos)	relación compuesto I / compuestos II + III
8,5	60	68:32
7	150	71:29
5	180	81:19

De la anterior tabla se desprende que en medio básico (pH = 8,5), la proporción del compuesto I era menor que en medio neutro (pH = 7), detectándose la mayor proporción del compuesto I en medio ácido (pH = 5).

Ejemplo 3

Para sintetizar 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa se disolvieron 6 g de o-nitrofenil β -D-galactopiranosido (Gal-ONP) y 25 g de D-xilosa en 330 ml de agua tamponada a pH 7 (KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,05 M, MgCl₂ 1 mM, mercaptoetanol 5 mM), se añadieron 2 mg (640 u) de enzima β -galactosidasa de *E. coli*, y la solución así obtenida se sometió a incubación a 30°C en un agitador orbital hasta que el Gal-ONP prácticamente se consumió (aproximadamente 4

ES 2 260 444 T3

horas). El seguimiento de la reacción se llevó a cabo por cromatografía en capa fina con isopropanol/NH₃(30%)/H₂O = 7,5/0,5/2,5 como eluyente y tomando como referencia los valores de Rf siguientes:

Rf (Gal-ONP):	0,58
Rf (D-xilosa):	0,47
Rf (4-O-β-D-galactopiranosil-D-xilosa):	0,17
Rf (2-O-β-D-galactopiranosil-D-xilosa + 3-O-β-D-galactopiranosil-D-xilosa):	0,26

La reacción se paró por calentamiento en baño de agua a 100°C durante 10 minutos, y seguidamente se extrajo el o-nitrofenol formado con CH₂Cl₂. La solución acuosa se concentró hasta sequedad y el residuo se acetiló de manera convencional (anhídrido acético/piridina = 1:1, a temperatura ambiente, durante una noche y con agitación magnética). Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se concentró y los residuos de piridina y anhídrido acético se eliminaron por adiciones y evaporaciones sucesivas de tolueno. Las sales precipitadas se filtraron, el filtrado se concentró hasta sequedad y el residuo se cromatografió en columna de gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente de hexano/acetato de etilo en una relación de 4:1 - 1:1. De la columna se eluyó primero la D-xilosa acetilada y después la mezcla de los disacáridos acetilados. Una vez concentradas las fracciones que contenían la mezcla de disacáridos, el residuo se disolvió en MeOH, se añadió una solución de MeONa/MeOH 1 M, y la mezcla así obtenida se agitó hasta que la desacetilación fue completa (seguimiento por tlc con isopropanol/NH₃/H₂O). La mezcla se neutralizó con AMBERLITA IR-120 (H⁺) y se concentró hasta sequedad. La mezcla de disacáridos libres se cristalizó dos veces sucesivas con MeOH/acetona, obteniéndose 1,07 g de 4-O-β-D-galactopiranosil-D-xilosa pura con un 17% de rendimiento basado en el Gal-ONP inicial. (Punto de fusión: 171-176°; ¹HRMN (D₂O): δ 5,17 y 4,58 (2D, 1H, J 3,8 y 7,8 Hz, H-1α y H-1β), 4,55 y 4,45 (2d, 1H, J 7,8 Hz, H-1'), 4,05 (dd, 1H, J 5,3 y 11,6 Hz, H-5e), 3,38 (dd, 1H, J 10,6 y 11,6 Hz), 3,25 (dd, 1H, J 7,8 y 9,4 Hz, H-2').

Ejemplo 4

Se preparó una columna de carbón activo/celita mezclando en seco 200 g de carbón activado (DARCO G-60) y 200 g de celita, y se añadió agua hasta que se formó una pasta homogénea. La pasta se trató con 150 ml de HCl (35%) para desactivar el carbón, así como para lavar restos de hierro y cenizas alcalinas, y posteriormente se lavó con agua hasta que las aguas de lavado salieron neutras. Una vez lavada, la pasta se empaquetó en una columna de cromatografía de 5 cm (φ) x 50 cm, y se compactó.

Para sintetizar 4-O-β-D-galactopiranosil-D-xilosa se disolvieron 5 g de o-nitrofenil β-D-galactopiranosido (Gal-ONP) y 25 g de D-xilosa en 330 ml de agua tamponada a pH 7 (KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,05 M, MgCl₂ 1 mM, mercaptoetanol 5 mM), se añadieron 2 mg (640 u) de enzima β-galactosidasa de *E. coli*, y se sometió la solución así obtenida a incubación a 37°C en un agitador orbital hasta que el Gal-ONP prácticamente se consumió (aproximadamente 2 horas). Siguiendo la metodología expuesta en el ejemplo 3, se paró la reacción por calentamiento a 100°C durante 10 minutos y se extrajo el orto-nitrofenol formado con acetato de etilo. La solución acuosa se concentró hasta un volumen aproximado de 50 ml, se filtró a través de lana de vidrio y se pasó por la columna de carbón activo/celita. En primer lugar, se eluyó con agua el exceso de D-xilosa y seguidamente, utilizando un gradiente fraccionado de EtOH/H₂O (2%-10% de EtOH) se recogió la mezcla de disacáridos. Las fracciones enriquecidas en el regioisómero 4-O-β-D-galactopiranosil-D-xilosa se combinaron y concentraron hasta un volumen reducido, tras lo cual se añadió acetona hasta la aparición de turbidez dejándose reposar la mezcla así obtenida en frío. La 4-O-β-D-galactopiranosil-D-xilosa cristalizó en forma pura, obteniéndose 970 mg, es decir, un rendimiento del 19% basado en el Gal-ONP inicial, cuyos datos espectrales coincidieron con los expuestos con respecto al producto obtenido de acuerdo con el ejemplo 3.

Ejemplo 5

Se preparó una columna de carbón activo/celita mezclando en seco 200 g de carbón activado (DARCO G-60) y 200 g de celita, y se añadió agua hasta que se formó una pasta homogénea. La pasta se trató con 150 ml de HCl (35%) para desactivar el carbón y lavar restos de hierro y cenizas alcalinas, y posteriormente se lavó con agua hasta que las aguas de lavado salieron neutras. Una vez lavada, la pasta se empaquetó en una columna de cromatografía de 5 cm (φ) x 50 cm, y se compactó.

Para sintetizar 4-O-β-D-galactopiranosil-D-xilosa se disolvieron 5 g de o-nitrofenil β-D-galactopiranosido (Gal-ONP) y 25 g de D-xilosa en 330 ml de agua tamponada a pH 7 (KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,05 M, MgCl₂ 1 mM, mercaptoetanol 5 mM), se añadieron 2 mg (640 u) de enzima β-galactosidasa de *E. coli*, y la solución así obtenida se sometió a incubación a 37°C en un agitador orbital hasta que el Gal-ONP prácticamente se consumió (aproximadamente 2 horas). Siguiendo la metodología expuesta en el ejemplo 3, se paró la reacción por calentamiento a 100°C durante 10 minutos y se extrajo el orto-nitrofenol formado con acetato de etilo. La solución acuosa se concentró hasta un volumen de aproximadamente 50 ml, se filtró a través de lana de vidrio y se pasó por la columna de carbón activo/celita.

Para cristalizar la 4-O-β-D-galactopiranosil-D-xilosa, en primer lugar se eluyó con agua el exceso de D-xilosa y seguidamente, utilizando un gradiente fraccionado de EtOH/H₂O (2%-10% de EtOH) se recogió la mezcla de disacáridos. Las fracciones enriquecidas en el regioisómero 4-O-β-D-galactopiranosil-D-xilosa se combinaron y se concentra-

ES 2 260 444 T3

ron hasta un volumen reducido y se disolvieron en la cantidad mínima posible de agua, tras lo cual se añadió acetona gota a gota, hasta la aparición de turbidez dejándose cristalizar la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante dos horas. Al cabo de dos horas se comprobó, con una capa fina del sobrenadante (transparente) que aún quedaba una cantidad de 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa sin cristalizar. Se volvió a añadir acetona hasta que hubo turbidez y se dejó reposar otras dos horas. Finalmente, se añadió más acetona y se almacenó la muestra en nevera durante la noche y se comprobó que el sobrenadante producido contenía sólo una mínima cantidad de 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa.

Los cristales de 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa se filtraron y lavaron con acetona. La 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa se obtuvo en forma pura, obteniéndose 1.557 mg, es decir, un rendimiento del 30% basado en el Gal-ONP inicial, cuyos datos espectrales coinciden con los expuestos con respecto al producto obtenido de acuerdo con el ejemplo 3.

Ejemplo 6

Se preparó una columna de carbón activo/celita mezclando en seco 200 g de carbón activado (DARCO G-60) y 200 g de celita, y se añadió agua hasta que se formó una pasta homogénea. La pasta se trató con 150 ml de HCl (35%) para desactivar el carbón y lavar restos de hierro y cenizas alcalinas, y posteriormente se lavó con agua hasta que las aguas de lavado salieron neutras. Una vez lavada, la pasta se empaquetó en una columna de cromatografía de 5 cm ϕ x 50 cm, y se compactó.

Para sintetizar 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa se disolvieron 5 g de o-nitrofenil β -D-galactopiranosido (Gal-ONP) y 25 g de D-xilosa en 330 ml de agua tamponada a pH 6,8 (KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,05 M, MgCl₂ 1 mM, mercaptoetanol 5 mM), se añadieron 70 unidades de enzima β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (MAXILACTR®), y la solución así obtenida se sometió a incubación a 37°C en un agitador orbital hasta que el Gal-ONP prácticamente se consumió (aproximadamente 2 horas). La reacción se siguió mediante cromatografía de capa fina con isopropanol/NH₃ (30%)/H₂O (7,5/0,5/2,5) dando como resultado los valores de Rf siguientes:

Rf (Gal-ONP):	0,58
Rf (D-xilosa):	0,47
Rf (4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa):	0,17
Rf (2-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa + 3-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa):	0,26

Siguiendo la metodología expuesta en el ejemplo 4, se paró la reacción por calentamiento a 100°C durante 10 minutos y se extrajo el orto-nitrofenol formado con acetato de etilo y se filtró para eliminar los residuos de la enzima. La solución acuosa se concentró a vacío hasta un volumen aproximado de 45 ml, y se pasó por columna de carbón activo/celita. En primer lugar, se eluyó con agua el exceso de D-xilosa y seguidamente, utilizando un gradiente fraccionado de EtOH/H₂O (2% 10% de EtOH) se recogió la mezcla de disacáridos. Las fracciones enriquecidas en el regioisómero 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa se combinaron y se concentraron hasta un volumen reducido, tras lo cual se añadió acetona hasta la aparición de turbidez dejándose reposar la mezcla así obtenida en frío. La 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa cristalizada se filtró por placa filtrante, obteniéndose 827 mg, es decir, un rendimiento del 16% basado en el Gal-ONP inicial.

Ejemplo 7

Se preparó una columna de carbón activo/celita mezclando en seco 200 g de carbón activado (DARCO G-60) y 200 g de celita, y se añadió agua hasta que se formó una pasta homogénea. La pasta se trató con 150 ml de HCl (35%) para desactivar el carbón y lavar restos de hierro y cenizas alcalinas, y posteriormente se lavó con agua hasta que las aguas de lavado salieron neutras. Una vez lavada, la pasta se empaquetó en una columna de cromatografía de 5 cm ϕ x 50 cm, y se compactó.

Para sintetizar 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa se disolvieron 5 g de o-nitrofenil β -D-galactopiranosido (Gal-ONP) y 25 g de D-xilosa en 330 ml de agua tamponada a pH 7 (KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,05 M, MgCl₂ 1 mM, mercaptoetanol 5 mM), se añadieron 80 unidades de enzima β -galactosidasa de *E. coli*, y la solución así obtenida se sometió a incubación a 37°C en un agitador orbital durante 24 horas. La reacción se siguió mediante cromatografía de capa fina con isopropanol/NH₃ (30%)/H₂O (7,5/0,5/2,5) dando como resultado los valores de Rf siguientes:

Rf (Gal-ONP):	0,58
Rf (D-xilosa):	0,47
Rf (4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa):	0,17
Rf (2-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa + 3-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa):	0,26

ES 2 260 444 T3

5 Siguiendo la metodología expuesta en el ejemplo 3, se paró la reacción por calentamiento a 100°C durante 10 minutos y se extrajo el orto-nitrofenol formado con acetato de etilo y se filtró para eliminar los residuos de la enzima. La solución acuosa se concentró a vacío hasta un volumen aproximado de 70 ml, y la solución concentrada se eluyó a través de una columna de carbón activo/celita. En primer lugar se eluyó con isopropanol/agua (2%) y se recogieron 1,3 litros. Después se recogieron fracciones al 4% hasta 2,6 litros, utilizándose un volumen total de 3,9 litros.

10 Las fracciones enriquecidas en el regioisómero 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa se combinaron y se concentraron hasta un volumen reducido, tras lo cual se añadió acetona hasta la aparición de turbidez dejándose reposar la mezcla así obtenida en frío. La 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa cristalizada se filtró por placa filtrante, obteniéndose 1.213 mg, es decir, un 24% basado en el Gal-ONP inicial.

Ejemplo 8

15 Se preparó una columna de carbón activo/celita mezclando en seco 24 g de carbón activado (DARCO G-60) y 24 g de celita, y se añadió agua hasta que se formó una pasta homogénea. La pasta se trató con 18 ml de HCl (35%) para desactivar el carbón así como lavar restos de hierro y cenizas alcalinas, y posteriormente se lavó con agua hasta que las aguas de lavado salieron neutras. Una vez lavada, se empaquetó en una columna de cromatografía y se compactó.

20 Para sintetizar 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa se disolvieron 5 g de o-nitrofenil β -D-galactopiranosido (Gal-ONP) y 25 g de D-xilosa en 330 ml de agua tamponada a pH 7 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,05 M, MgCl_2 1 mM, mercaptoetanol 5 mM), se añadieron 80 unidades de enzima β -galactosidasa de *E. coli*, y la solución así obtenida se sometió a incubación a 37°C en un agitador orbital hasta que el Gal-ONP prácticamente se consumió (24 horas). La reacción se siguió mediante cromatografía de capa fina con isopropanol/ NH_3 (30%)/ H_2O (7,5/0,5/2,5) de manera análoga a la indicada en el ejemplo 7. Siguiendo la metodología expuesta en el ejemplo 3, se paró la reacción por calentamiento a 100°C durante 10 minutos, se dejó enfriar y se extrajo el orto-nitrofenol formado con acetato de etilo. A la solución acuosa se añadió celita (40 g) y la mezcla se concentró hasta sequedad. El residuo sólido se sometió a una extracción sólido-líquido usando un extractor "Soxhlet" equipado con cartucho de celulosa y usando acetato de etilo (500 ml) como disolvente. Al cabo de 23 horas, el sólido resultante se lavó con agua (3 x 40 ml) y la solución acuosa se eluyó a través de la columna de carbón activo-celita. En primer lugar se eluyó con isopropanol/agua (2%) y a continuación con isopropanol/agua (4%), utilizándose un volumen total de eluyente de 400 ml. Las fracciones enriquecidas en el regioisómero 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa se combinaron y se concentraron hasta sequedad. El residuo se cristalizó de acetona-agua de manera similar a la descrita en el ejemplo 7, obteniéndose 0,44 g de disacárido puro y cristalino.

Ejemplo 9

35 Para sintetizar 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa, se disolvieron 4,12 g de o-nitrofenil β -D-galactopiranosido (Gal-ONP) y 20,6 g de D-xilosa en 272 ml de agua taponada a pH 7 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,05 M, MgCl_2 1 mM, mercaptoetanol 5 mM), se añadieron 66 unidades de enzima β -galactosidasa de *E. coli*, y la solución así obtenida se sometió a incubación a 37°C en un agitador orbital hasta que el Gal-ONP prácticamente se consumió (21 horas). La reacción de detuvo por enfriamiento a 0°C y se filtró el o-nitrofenol como un sólido. Al filtrado se le añadieron 40 60 g de carbón activo y la mezcla resultante se agitó durante 30 min. Por medio de tlc del sobrenadante se observó la ausencia de disacárido en la solución, al estar adsorbido sobre el carbón activo. La mezcla se filtró y el sólido de carbón activo se lavó con agua (400 ml), isopropanol al 2% (100 ml), isopropanol al 4% (200 ml) e isopropanol al 6% (200 ml). Las fracciones que contenían disacárido 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa se concentraron y el residuo 45 (2,38 g) se cristalizó de acetona-agua, obteniéndose 1,55 g de un sólido que se cristalizó de nuevo de la misma mezcla de disolventes de manera similar a la utilizada en el ejemplo 7. Se obtuvieron 1,32 g de disacárido puro (32%).

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento enzimático para obtener 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa que comprende:

5 una primera etapa de preparación de una primera mezcla de reacción de

2-20% en peso de D-xilosa

10 0,5-5% en peso de un sustrato β -D-galactopiranosido

75-97,5% en peso de un medio de reacción que comprende agua tamponada a un pH entre 5,0 y 9,0;

añadiéndose de 10 a 1.000 unidades de una enzima β -D-galactosidasa, por gramo de β -D-galactopiranosido, a la primera mezcla de reacción; y obteniéndose una segunda mezcla de reacción;

15 una segunda etapa en la que la segunda mezcla de reacción se somete a una reacción a una temperatura comprendida entre una temperatura superior al punto de congelación de la segunda mezcla de reacción y 45°C, durante 2 a 48 horas, para formar disacáridos en la segunda mezcla de reacción;

20 una tercera etapa en la que se para la reacción cuando se han formado los disacáridos en la cantidad deseada, mediante un tratamiento elegido entre desactivación de la β -D-galactosidasa por congelación de la segunda mezcla de reacción a una temperatura entre -20°C y -170°C, desactivación de la β -D-galactosidasa por calentamiento de la segunda mezcla de reacción a una temperatura entre 95 y 110°C, y separación de la β -D-galactosidasa de la segunda mezcla de reacción por ultrafiltración; obteniéndose una tercera mezcla de reacción;

25 una cuarta etapa en la que se separa de la tercera mezcla de reacción, mediante extracción o filtración, un fragmento aglicónico del sustrato β -D-galactopiranosido usado en la primera etapa; obteniéndose una cuarta mezcla de reacción;

30 una quinta etapa que comprende el aislamiento de fracciones que contienen 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa, **caracterizada** porque, esta etapa de aislamiento se selecciona entre:

35 i) adición de celita a la cuarta mezcla de reacción, seguida de extracción sólido-líquido con un disolvente y elución con un primer eluyente en una columna o

ii) adición de carbón activo a la cuarta mezcla de reacción seguida de filtración y elución con un segundo eluyente

40 una sexta etapa, en la que las fracciones que contienen 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa se cristalizan en una mezcla de cristalización seleccionada entre:

i) mezclas de acetona/metanol en una relación entre 5/1 y 20/1 o

45 ii) mezclas de acetona/agua en una relación entre 5/1 y 20/1.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la cuarta mezcla de reacción se concentra antes de someterse a la elución en la columna.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la mezcla de acetona/metanol presenta una relación de 10/1.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la mezcla de acetona/agua presenta una relación de 10/1.

55 5. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el primer eluyente es una mezcla de agua/isopropanol que contiene 1 a 10% (v/v) de isopropanol.

60 6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la mezcla agua/isopropanol contiene un 2% (v/v) de isopropanol.

65 7. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la quinta etapa consiste en la adición de celita a la cuarta mezcla de reacción y concentración hasta sequedad, seguida de una extracción sólido-líquido con un disolvente orgánico en un extractor Soxhlet que lleva un cartucho hecho de un material compatible con dicho disolvente orgánico, y elución con un primer eluyente en una columna seleccionada entre columnas de filtración con rellenos de polímeros de dextranos entrecruzados, columnas de filtración con rellenos de polímeros de acrilamida, columnas de filtración de carbón activo o columnas de carbón activo-celita.

ES 2 260 444 T3

8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque el disolvente orgánico es acetato de etilo.
9. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque el disolvente orgánico se usa en una cantidad comprendida entre 10 ml y 25 ml por gramo de xilosa inicial.
- 5 10. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque la celita se usa en una cantidad comprendida entre 1 g y 2 g por gramo de xilosa inicial.
- 10 11. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque la columna es de carbón activo-celita en la que se desactiva el carbón mediante adición de ácido clorhídrico al 35%.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la celita se usa en una cantidad comprendida entre 0,5 g y 2 g de celita por gramo de xilosa inicial.
- 15 13. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque el carbón activo se usa en una cantidad comprendida entre 0,5 g y 2 g de carbón activo por gramo de xilosa inicial.
14. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque dicho primer eluyente se usa en una cantidad comprendida entre 5 ml y 25 ml por gramo de xilosa inicial.
- 20 15. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque el ácido clorhídrico se usa en una cantidad comprendida entre 0,5 ml y 1,5 ml por gramo de xilosa inicial.
- 25 16. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque en la quinta etapa, la cuarta mezcla de reacción se somete a una adición directa de al menos un segundo eluyente sobre el carbón activo en el que la 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa se absorbe y el segundo eluyente es agua seguida de isopropanol diluido con proporción creciente en volumen de isopropanol en etapas sucesivas.
- 30 17. Procedimiento según la reivindicación 16, **caracterizado** porque la proporción en volumen de isopropanol está comprendida entre 1% y 3% en una primera etapa, entre 3% y 5% en una segunda etapa, y entre 5% y 7% en una tercera etapa.
- 35 18. Procedimiento según la reivindicación 16, **caracterizado** porque el carbón activo se usa en una cantidad comprendida entre 2 g y 4 g de carbón activo por gramo de xilosa inicial.
19. Procedimiento según la reivindicación 16, **caracterizado** porque el segundo eluyente se usa en una cantidad total comprendida entre 30 ml y 50 ml de segundo eluyente por gramo de xilosa inicial.
- 40 20. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 16, **caracterizado** porque la reacción se para por enfriamiento de la segunda mezcla de reacción a 0°C.
21. Procedimiento según la reivindicación 1, 16, y 20, **caracterizado** porque la cuarta mezcla de reacción se obtiene por separación del fragmento aglicónico del sustrato β -D-galactopiranosido mediante filtración.
- 45 22. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la proporción de D-xilosa en la segunda mezcla de reacción es de 7,5% en peso.
23. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la proporción del β -D-galactopiranosido en la segunda mezcla de reacción es de 1,5% en peso.
- 50 24. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se añaden 20 unidades de β -D-galactosidasa por gramo de R-D-galactopiranosido.
25. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el medio de reacción comprende además al menos un medio co-disolvente seleccionado entre dimetilsulfóxido, dimetilformamida, dioxano y mezclas de los mismos.
- 55 26. Procedimiento según la reivindicación 25, **caracterizado** porque el medio de reacción comprende 20% en peso del medio co-disolvente.
- 60 27. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la reacción se lleva a cabo a temperatura constante.
28. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 27, **caracterizado** porque la temperatura de reacción es de -5°C a 65 40°C.
29. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 27, **caracterizado** porque la temperatura de reacción es superior a la temperatura de congelación de la segunda mezcla e inferior a 0°C.

ES 2 260 444 T3

30. Procedimiento según la reivindicación 1, 28 ó 29, **caracterizado** porque la temperatura de reacción es de -5°C.

31. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 28, **caracterizado** porque la temperatura de reacción es temperatura ambiente.

5

32. Procedimiento según la reivindicación 1, 26 ó 27, **caracterizado** porque el medio de reacción está tamponado a pH 7.

10

33. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque, en la tercera etapa, la reacción se para mediante congelación de la segunda mezcla de reacción a una temperatura de -78°C.

34. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque, en la tercera etapa, la reacción se para mediante calentamiento de la segunda mezcla de reacción hasta una temperatura de 100°C.

15

35. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque, en la tercera etapa, la reacción se para mediante una separación de la β -D-galactosidasa por ultrafiltración.

20

36. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el sustrato β -D-galactopiranosido se selecciona entre o-nitrofenil β -D-galactopiranosido y lactosa.

37. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la enzima β -D-galactosidasa es β -D-galactosidasa de *E. coli*.

25

38. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la enzima β -D-galactosidasa es β -D-galactosidasa de *Kluyveramyces lactis*.

30

35

40

45

50

55

60

65