

Oligosacàrids funcionals per síntesi enzimàtica. Nous enzims per a noves aplicacions

RESUM: Davant l'interès creixent per les funcionalitats dels hidrats de carboni en l'organisme, la síntesi eficient d'oligosacàrids més complexos i polisacàrids esdevé una necessitat. Les estructures dels carbohidrats existents són el resultat de l'acció dels enzims glicosil transferases i els enzims glicosidases. La utilització d'aquests enzims in vitro és, per a la majoria de glicosil transferases, de moment, no rendible i per a les glicosidases, poc eficient, ja que la seva funció principal és la hidròlisi i, per tant, els rendiments de síntesi són baixos. El redisseny de glicosidases per tècniques d'enginyeria de proteïnes permet modificar l'activitat enzimàtica cap a la síntesi, eliminant la seva activitat hidrolítica. Aquests nous mutants, anomenats glicosintases, produeixen oligo i polisacàrids amb rendiments generalment quantitativus.

PARAULES CLAU: Hidrats de carboni, síntesi enzimàtica, glicosidases, glicosintases.

SUMMARY: Due to the increasing interest in functions of carbohydrates in the organism, efficient synthesis of more complex oligosaccharides and polysaccharides becomes a need. The carbohydrate structures that are present are the result of the action of glycosyl transferases enzymes and glycosidases enzymes. The use of these enzymes in vitro is, in the case of the majority of glycosyl transferases, by now not profitable, and in the case of the glycosidases is slightly efficient, because their main function is hydrolysis and then, yields in synthesis are low. The redesign of these glycosidases using protein engineering techniques allows to modify their enzymatic activity to the synthesis, eliminating the hydrolysis activity. These news mutants, called glycosynthases, afford oligo and polysaccharides generally in quantitative yields.

MAGDA FAJES I ANTONI PLANAS

Laboratori de Bioquímica,
Institut Químic de Sarrià,
Universitat Ramon Llull,
08017 Barcelona

Cada vegada està prenent més rellevància la recerca d'estructures d'hidrats de carboni amb noves propietats funcionals en els sectors alimentari i biomèdic. Els hidrats de carboni ja han deixat de tenir només una funció energètica, com es considera la reserva de midó, o una funció estructural, com en el cas de la

cel·lulosa, component de les parets cel·lulars. La glicobiologia ha donat a conèixer que els carbohidrats, juntament amb proteïnes i lípids, glicoconjugats en general, participen en processos de reconeixement i senyalització molecular.¹ La importància d'aquestes funcions ha creat expectatives en l'alimentació des del punt de vista nutricional,

funcional i tecnològic, i en la biomedicina, des del punt de vista de mediadors d'interaccions entre cèl·lules. Així doncs, l'interès per l'obtenció eficient dels hidrats de carboni ja coneguts i de noves estructures (nova generació), junt amb l'estudi de la seva funcionalitat, ha anat creixent i és motiu d'una intensa recerca actual.

De fet, la varietat de les estructures d'hidrats de carboni és molt

més, poden estar ramificats. Aquestes característiques generen tota la diversitat existent però, alhora, impliquen estrictes requeriments de regio i estereoespecificitat en la síntesi d'una estructura.

In vivo, els carbohidrats se sintetitzen per l'acció dels enzims glicosil transferases de forma unívoca gràcies a la pròpia regio i estereoespecificitat enzimàtica. En canvi, *in vitro*, la seva síntesi química és

d'extracció d'oligosacàrids i polisacàrids tradicionals, com el midó, la sacarosa i la lactosa, que es degraden per acció enzimàtica per generar els diferents carbohidrats que actualment s'utilitzen com a edulcorants, font d'energia, estabilitzants, emulsionants o ingredients funcionals^{3,4} (taula 1).

Així, per exemple, els maltooligosacàrids, components dels xarops de glucosa, són obtinguts per hidròlisi de midó per amilases. Les ciclodextrines, l'estructura cíclica de les quals permet l'encapsulament d'aromes o espècies, millorant la seva estabilitat, s'obtenen per acció de ciclodextrintransferases de diferents *Bacillus*.⁵ I els fructooligosacàrids, considerats com a prebiòtics, s'han obtingut per transglicosidació de la fructosa de la sacarosa a glucosa per l'acció de fructosil transferases d'*Aspergillus niger* i *Aureobasidium pullulans*, o de forma més econòmica, a partir de la hidròlisi enzimàtica de la inulina de l'extracte d'arrels de xicoira.^{6,7}

De fet, aquests enzims són els propis enzims dels organismes i, per tant, són les glicosil transferases, que sintetitzen oligosacàrids, i les glicosidases, que actuen hidrolitzant-los. Tot i així, en la majoria d'aquestes aplicacions s'utilitzen les glicosidases tant sigui per hidròlisi com per síntesi de carbohidrats. Per exemple, la funció principal de les β -galactosidases és la hidròlisi de substrats com lactosa, però també són capaces de condensar un glicòsid donador amb un glicòsid acceptor. Així, poden sintetitzar el disacàrid Gal β 4Xyl a partir d'un galactosid com a donador i un xilòsid com a acceptor⁸ o produir oligosacàrids de galactosa (GOS) a partir de lactosa excedent de la indústria alimentària.⁹ La reacció de les glicosidases afavorida termodinàmicament és la hidròlisi, però, en certes condicions *in vitro*, aquests enzims poden dur a terme la reacció de condensació. Els rendiments de síntesi no superen el 50 % i sempre són inferiors als de les glicosil transferases, però els donadors i acceptors glicosídics inicials són més simples i barats i, a més, les gli-

Els hidrats de carboni ja han deixat de tenir només una funció energètica, com es considera la reserva de midó, o una funció estructural, com en el cas de la cel·lulosa

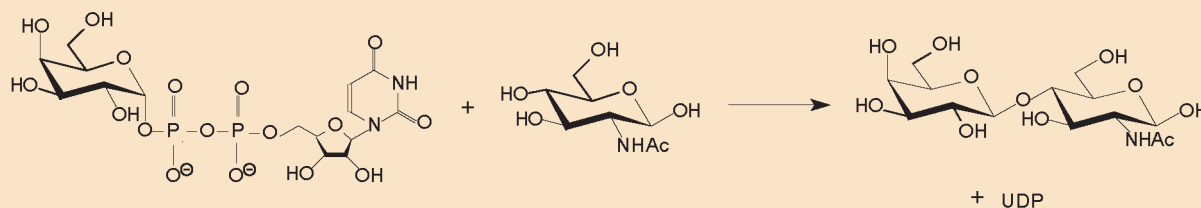
àmplia. Mentre que quatre aminoàcids o nucleòtids poden generar quaranta-vuit tetràmers possibles, quatre monosacàrids diferents poden unir-se de diferents maneres donant lloc a 35.560 possibles tetrasacàrids.² Els oligosacàrids són molècules altament funcionalitzades, amb enllaços a i/o b i que, a

complicada, ja que els diferents grups hidroxils són de similar reactivitat i es requereix un gran nombre de passos de protecció, desprotecció i activació per evitar la formació dels possibles isòmers. De tal manera que, des del punt de vista d'aplicació alimentària, l'obtenció dels carbohidrats és a partir

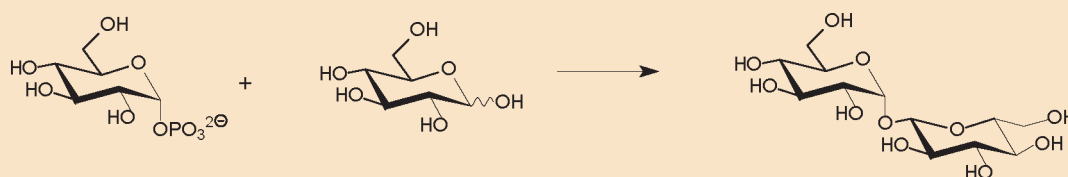
TAULA 1. Tipus d'oligosacàrids produïts en el sector alimentari i les seves fonts

Font	Oligosacàrids
Midó	Maltooligosacàrids: de maltosa a maltoheptosa. Isomaltooligosacàrids: isomaltosa, panosa, isomaltotriosa. Ciclodextrines (CD): α -CD, β -CD, γ -CD, CD ramificades. Altres: manitol, gentiooligosacàrids, trealosa, nigerosa
Sacarosa	Glicosil sacarosa, fructooligosacàrids, isomaltulosa, lactosacarosa, xilosacarosa, rafinosa, estaquirosa, etc.
Lactosa	Galactooligosacàrids, lactosacarosa, lactulosa, lactitol
Xilà, quitina, quitosan	Xilooligosacàrids, oligosacàrids de quitina o quitosan, etc.

a) Leloir: β -1,4-galactosil transferasa



b) No Leloir: fosforilasa de trealosa



c) Transglicosidases: ciclodextrin glicosil transferasa

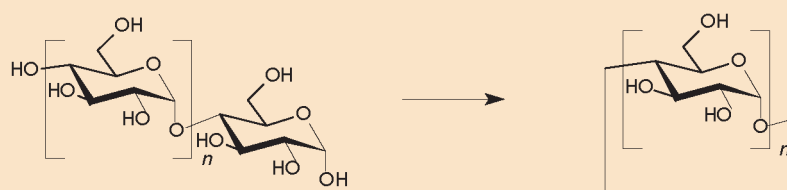


FIGURA 1. Biosíntesi d'oligosacàrids per glicosil transferases: a) tipus Leloir, b) tipus no Leloir, i c) transglicosidases.

cosidases són més fàcilment manipulables i expressables en microorganismes. Per contra, les glicosil transferases han estat difícils d'expressar perquè són majoritàriament proteïnes de membrana i, a més, o bé utilitzen substrats molt cars com és el cas de les glicosil transferases tipus Leloir (figura 1), en què el seu donador és un nucleòtid de glicosil, o bé són específiques per a pocs substrats com les glicosil transferases tipus no Leloir i les transglicosidases. Per exemple, la ciclodextrin glicosil transferasa, que catalitza la condensació de maltooligosacàrids per a l'obtenció de ciclodextrines,⁵ o la dextransucrasa, que transglicosida sacarosa per a l'obtenció de dextrans, són transglicosidases.¹⁰

ENZIMS GLICOSIDASES EN SÍNTESI D'HIDRATS DE CARBONI

Davant de tot això, els enzims glicosidases es consideren eines potencials per a la síntesi de la diversitat

dels carbohidrats. El seu mecanisme d'acció ha estat àmpliament estudiat. Pel que fa a la reacció hidrolítica, aquests enzims catalitzen la hidròlisi dels enllaços glicosídics mitjançant un mecanisme d'inversió o de retenció. Les glicosidases que actuen amb mecanisme d'inversió alliberen l'oligosacàrid amb el carboni anomèric amb configuració invertida i, en canvi, les de mecanisme de retenció mantenen l'estereoquímica d'aquest carboni.¹¹ En els dos casos, dos aminoàcids són els residus essencials i la catàlisi és àcid-base general.^{12,13} Per exemple, en les glicosidases amb retenció de configuració (figura 2a), l'aminoàcid que actua de nucleòfil ataca el carbònic anomèric de l'oligosacàrid alhora que l'altre aminoàcid protona l'oxigen glicosídic. Aquest pas de reacció hidrolitza l'enllaç glicosídic alliberant, per una banda, una part d'oligosacàrid i, per l'altra, donant lloc a l'intermedi de reacció glicosil-enzim. En el segon pas de reacció, l'aminoàcid àcid-base augmenta la nucleofí-

lia d'una molècula d'aigua que ataca l'intermedi i rendeix l'oligosacàrid lliure amb retenció de configuració. En certes condicions (figura 2b), és favorable que reaccionï una molècula oligosacàrid en comptes d'una molècula d'aigua, i es doni la reacció entre els dos glicòsids i s'obtingui el producte de condensació. Per exemple, quan s'utilitza una alta concentració dels dos substrats usant-ne un com a dissolvent o es redueix la quantitat d'aigua utilitzant dissolvents orgànics o s'augmenta la temperatura, es desplaça l'equilibri i els rendiments de síntesi augmenten.¹⁴⁻¹⁶ Tot i així, els rendiments són baixos perquè, tot i que l'enzim condensa el donador i l'acceptor glicosídic, l'enzim presenta la maquinària catalítica per la hidròlisi i, per tant, el producte de condensació és substrat de l'enzim i pot ser hidrolitzat. Diferents estratègies s'han dut a terme per resoldre aquest problema. S'ha eliminat el producte de condensació del medi de reacció per cristallització del producte *in situ* o adsorció, o

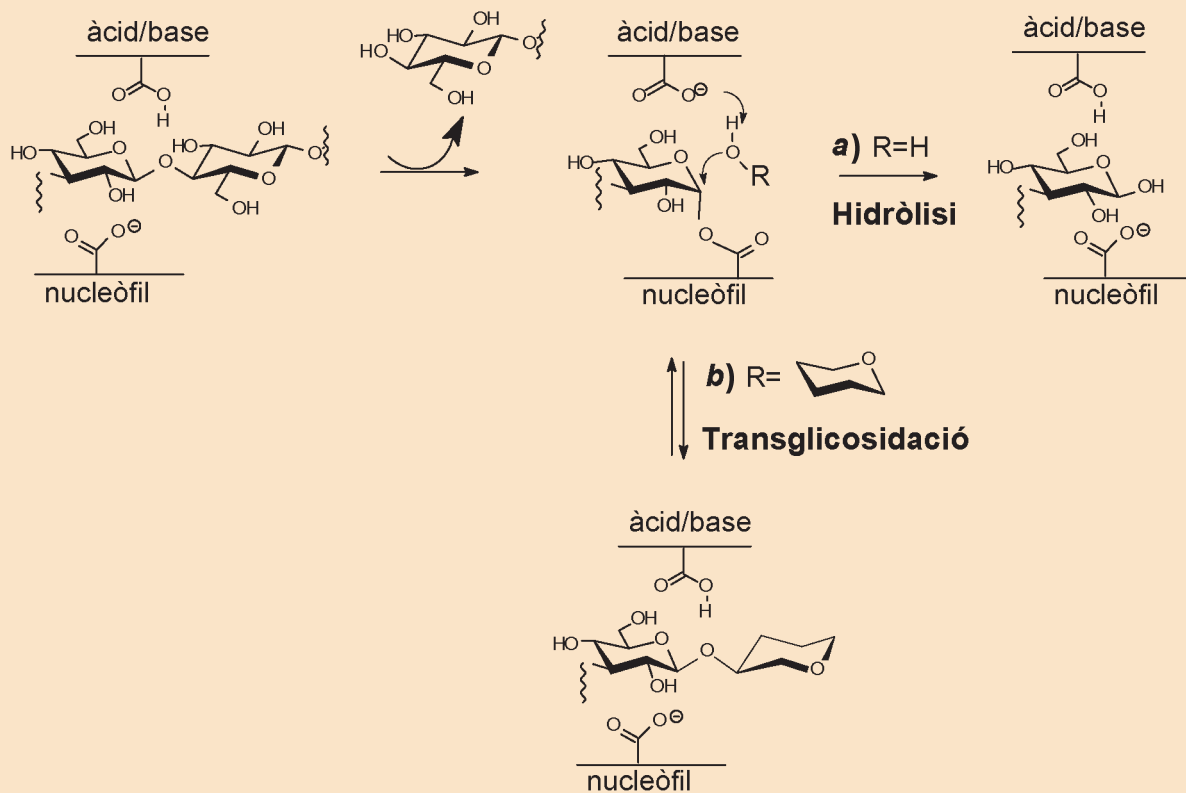


FIGURA 2. Reaccions de glicosidases que actuen segons mecanisme de retenció de configuració: a) reacció d'hidròlisi, b) reacció de síntesi.

bé s'ha estabilitzat l'enzim enfront a temperatura i dissolvents orgànics gràcies a la immobilització enzimàtica.^{9,17,18}

REDISSENY RACIONAL DE GLICOSIDASES A GLICOSINTASES

Finalment, però, coneixent el mecanisme d'acció de l'enzim, les glico-

sidases amb retenció de configuració van ser redissenyades per tal que la seva única funció fos la síntesi. L'any 1998, Withers *et al.*¹⁹ introdueixen el concepte glicosintasa per a enzims exoglicosidases i Planas *et al.*²⁰ per a enzims endoglicosidases. Aquest concepte es basa en el següent (figura 3):

— D'una banda, es muta l'aminoàcid que actua de nucleòfil per un aminoàcid no nucleofílic, com ala-

nina, per tal que no pugui iniciar la reacció d'hidròlisi.

— I d'altra banda, s'ofereix un substrat amb configuració α per tal que mimetitzi l'intermedi de reacció.

Els dos grups confirmen que els mutants del nucleòfil E358A de l'exoglicosidasa d'*Agrobacterium* sp. i l'E134A de l'endoglicosidasa de *Bacillus licheniformis* no poden hidrolitzar oligosacàrids, però sí són

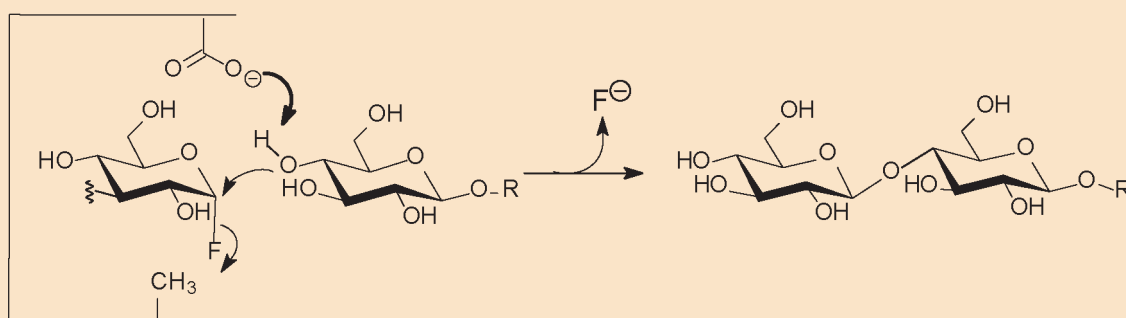


FIGURA 3. Activitat glicosintasa entre el donador fluorur activat i un acceptor glicosídic pels mutants del nucleòfil E358A de l'exoglicosidasa d'*Agrobacterium* sp. i E134A de l'endoglicosidasa de *Bacillus licheniformis*.

capaços de sintetitzar-ne a partir de donadors activats amb configuració α . Aquests mutants s'anomenen glicosintases.

A partir de llavors, s'aplica aquesta metodologia a altres glicosidases amb diferents especificitats²¹⁻³¹ i es confirma el mecanisme d'aquests mutants.³² La figura 3

mostra que l'aminoàcid que en la reacció d'hidròlisi actua d'àcid-base, en el mutant glicosintasa actua de base augmentant la nucleofília d'una molècula acceptora que ataca el carboni anomèric del donador glicosídic donant el producte de condensació. L'absència del residu nucleòfil evita la hidròlisi d'aquest

producte i s'aconsegueixen rendiments de condensació superiors al 90 %. La taula 2 presenta els enzims glicosintases redissenyats a data d'avui i els enllaços glicosídics que formen. Mono-, di-, tri- i tetrasacàrids poden ser condensats mitjançant nous enllaços β -1,3, β -1,4, β -1,6 o α -1,4 i α -1,6 pels mutants d'aquestes

TAULA 2. Glicosintases existents a data d'avui i l'enllaç glicosídic que poden formar

Exoglicosintases			
Enzims	Mutants	Productes	Grup de recerca
β -glicosidasa <i>Agrobacterium</i> sp.	E358A E358S	β -1,4 (β -1,3)	Withers <i>et al.</i> ^{19,21}
β -glicosidasa <i>Sulfolobus solfataricus</i>	E387G	β -1,3; β -1,4; β -1,6	Moracci <i>et al.</i> ²²
β -manosidasa <i>Cellulomonas fimi</i>	E519A E519A	β -1,4	Withers <i>et al.</i> ²³
β -galactosidasa <i>Escherichia coli</i>	E537S E794D/E537S	β -1,6	Withers <i>et al.</i> ²⁴
α -glucosidasa <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	D481G	α -1,4; α -1,6	Chiba <i>et al.</i> ²⁵
β -glicosidasa <i>Streptomyces</i> sp.	E383A	β -1,3 (β -1,4)	Planas <i>et al.</i> ²⁶
β -glicosidasa <i>Thermosphaera aggregans</i>	E386A	β -1,3; β -1,4; β -1,6	Moracci, Van der Oost <i>et al.</i> ²⁷
β -glicosidasa <i>Pyrococcus furiosus</i>	E372A	β -1,3	Moracci, Van der Oost <i>et al.</i> ²⁷
Endoglicosintases			
Enzims	Mutants	Productes	Referències
1,3-1,4- β -glucanasa <i>Bacillus licheniformis</i>	E134A	β -1,4	Planas <i>et al.</i> ²⁰
1,4- β -glucanasa <i>Humicola insolens</i>	E197A	β -1,4	Driguez <i>et al.</i> ²⁸
1,3- β -glucanasa <i>Pyrococcus furiosus</i>	E170A	β -1,3	Planas, Van der Oost <i>et al.</i> ²⁹
1,3- β -glucanasa d'ordi	E231G E231A E231S	β -1,3	Fincher <i>et al.</i> ³⁰
β -mananasa <i>Cellvibrio japonicus</i>	E320G E320S	β -1,4	Withers <i>et al.</i> ³¹

glicosidases. Aquests enzims encara no cobreixen totes les possibles combinacions generades a partir, per exemple, de quatre monòmers, però s'estan explorant nous mutants glicosintasa, al mateix temps que aquests enzims s'estan transformant en eines sintètiques per a la síntesi de carbohidrats.

glicosídics interns d'oligo i polisacàrids amb enllaços β -1,3 i β -1,4, com el β -glucà.^{33,34} Presenta una alta regioselectivitat, ja que només hidrolitza l'enllaç β -1,4 d'unitats de glucosa que tenen enllaç β -1,3. A diferència d'aquest enzim, la glicosidasa de *Streptomyces* sp. és un enzim exo i per tant, hidrolitza oli-

verteix aquestes glicosidases en glicosintases^{20,26} (figura 4). El mutant E134A de l'1,3-1,4- β -glucanasa condensa el donador laminaribiosid amb l'acceptor monosacàrid, rendint el corresponent trisacàrid amb un nou enllaç β -1,4, mentre que el mutant E383A de la β -glicosidasa transglicosida el fluorur de glucosil amb el glicòsid obtenint el disacàrid amb enllaç β -1,3. En els dos casos, els rendiments són quantitius.

L'àmplia especificitat d'aquesta exoglicosidasa fa atractiva l'exploració de la capacitat de síntesi d'aquest enzim enfront de diversos donadors i acceptors. Tal com mostra la taula 3, s'assagen tres donadors, els fluorurs de glucosil, galactosil i xilosil, amb vuit acceptors. D'aquestes diferents combinacions, l'enzim és capaç de condensar els fluorurs de glucosil i galactosil amb els corresponents monosacàrids glucosa, galactosa, xilosa, manosa i fucosa i els disacàrids laminaribiosa i cel·lobiosa. El fluorur de xilosil no actua de donador, cosa que confirma que el grup 5-hidroximetil present en la glucosa i absent en la xilosa és important per l'afinitat donador-enzim. I tampoc és acceptor el 2-*N*-acetamidoglicòsid (GlcNAc β -PNP), monosacàrid present en els *N*-glicans de les cèl·lules. Quan l'acceptor és un monosacàrid,

L'interès per l'obtenció eficient dels hidrats de carboni ja coneguts i de noves estructures, junt amb l'estudi de la seva funcionalitat, ha anat creixent i és motiu d'una intensa recerca actual

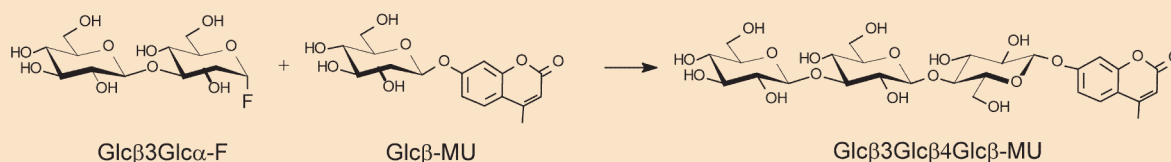
A títol d'exemple, en el grup s'ha desenvolupat aquesta estratègia en dos enzims: l'endoglicosidasa de *B. licheniformis* i l'exoglicosidasa de *Streptomyces* sp.

L'endoglicosidasa és una 1,3-1,4- β -glucanasa i hidrolitza enllaços

gosacàrids pels extrems.^{35,36} Hidrolitza unitats de glucoses unides per enllaços β -1,4, β -1,3 i β -1,2 i, a més, presenta activitat fucosidasa i galactosidasa.

La mutació del residu nucleòfil a alanina en aquests dos enzims con-

a) E134A endoglucanasa



b) E383A exoglicosidasa

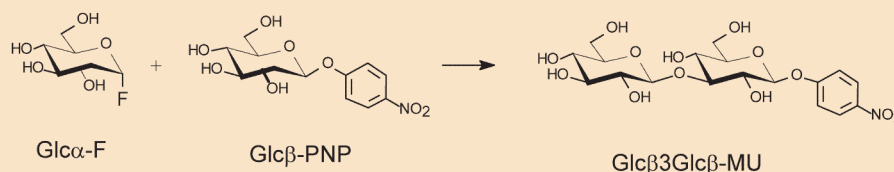
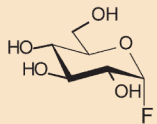
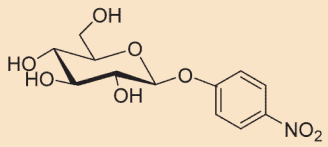
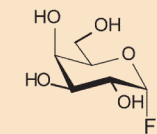
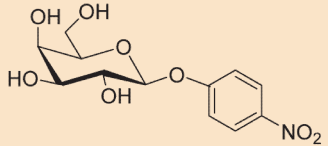
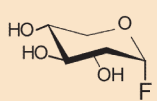
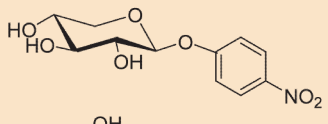
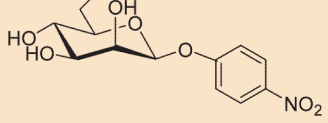
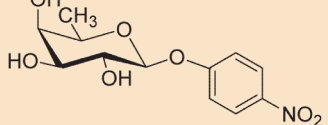
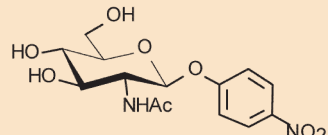
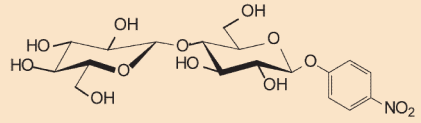
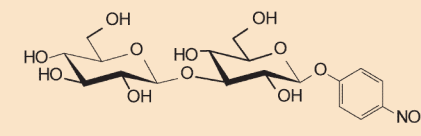


FIGURA 4. a) Condensació del donador fluorur de laminaribiosil (Glc β 3Glc- α F) amb l'acceptor 4-metilumbel·liferil glucòsid (Glc β -MU) pel mutant E134A de l'endo-1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. b) Transglicosidació del fluorur de glucòsid (Glc α -F) amb el 4-*p*-nitrofenil glucòsid (Glc β -PNP) pel mutant E383A de l'exo- β -glicosidasa de *Streptomyces* sp.

TAULA 3. Combinació de donadors i acceptors assajats i productes de condensació obtinguts pel mutant E383A de l'exoglicosidasa. n. r.: no reacciona

Donador	Acceptors	Productes
 Glcα-F	 Glcβ-PNP	Glcβ3Glcβ-PNP Galβ3Glcβ-PNP
 Galα-F	 Galβ-PNP	Galβ3Glcβ-PNP Galβ3Galβ-PNP
 Xylα-F	 Xylβ-PNP	Glcβ3Xylβ-PNP Glcβ4Xylβ-PNP Galβ3Xylβ-PNP Galβ4Xylβ-PNP
	 Manβ-PNP	Glcβ3Manβ-PNP Galβ3Manβ-PNP
	 Fucβ-PNP	Glcβ3Fucβ-PNP
	 GlcNAcβ-PNP	n. r.
	 Glcβ4Glcβ-PNP	Glcβ4Glcβ4Glcβ-PNP
	 Glcβ3Glcβ-PNP	Glcβ4 Glcβ3Glcβ-PNP

el nou enllaç glicosídic format és específicament β-1,3, a excepció de l'acceptor xilòsid que dona tant el disacàrid β-1,3 com β-1,4. S'entén, doncs, que la presència del grup 5-hidroximetil en els acceptors intervé en l'orientació de l'acceptor en el centre actiu de l'enzim: en la seva presència, orienta l'hidroxil en 3 per transglicosidar i, en la seva absència, aquesta especificitat es veu relaxada i transglicosida tant l'hidroxil en 3 com en 4. Aquesta influència és encara més determinant quan els acceptors són disacàrids. En aquest

cas, el nou enllaç glicosídic és exclusivament β-1,4. En resum, aquest enzim és capaç de produir aquests tretze oligosacàrids amb rendiments que varien entre el 30 % i el 100 %.

El mutant glicosintasa de l'1,3-1,4-β-glucanasa, en ser un enzim endo, és capaç de sintetitzar oligosacàrids més complexos. L'èxit d'aquesta estratègia es confirma amb l'hexasacàrid Galβ4Glcβ4Glcβ3Glcβ4Glcβ4Glcβ-OMe, que té com a particularitat la presència d'enllaços tant β-1,3 com β-1,4 i és el millor substrat

per a l'anàlisi estructura-funció del propi enzim 1,3-1,4-β-glucanasa. Les síntesis d'aquest carbohidrat dutes a terme anteriorment pel grup sempre presenten rendiments inferiors al 20 %. En canvi, la reacció *one-pot* de dues glicosintases rendeix aquest oligosacàrid de manera quantitativa³⁷ (figura 5). Els substrats inicials **1**, **2** i **3** són tres disacàrids senzills de preparar i les reaccions que es duen a terme es donen segons la següent seqüència: els tres substrats són presents en la mescla inicial i els fluorurs de lactosil **1** i laminaribiosil

Els enzims glicosintases, redissenyats a partir de les glicosidases, es consideren eines potencials per a la síntesi específica i controlada de nous hidrats de carboni

OMe. Després de la seva purificació, s'obté l'hexasacàrid objectiu amb un rendiment del 80 %.

A més, l'habilitat d'aquesta endo-glicosintasa s'ha estès a la síntesi *in vitro* de polisacàrids³⁸ (figura 5). El donador fluorur de laminaribiosil (Glc β 3Glc- α F) és autocondensat i polimeritzat pel mutant glicosintasa via enllaç β -1,4, i rendeix un nou polisacàrid d'enllaços alternants β -1,3 i β -1,4.

Aquestes aplicacions han fet que els enzims glicosintases, redissenyats a partir de les glicosidases, es considerin eines potencials per a la síntesi específica i controlada de nous hidrats de carboni. En l'àmbit alimentari, aquesta metodologia

2 són condensats específicament pel mutant E197A de l'1,4- β -glucanasa d'*Humicola insolens* per rendir el tetrasacàrid **4** (Gal β 4Glc β 4Glc β 3-Glc α -F) amb un nou enllaç glicosídic β -1,4. Un cop acabada aquesta reacció, s'addiciona el mutant E134A de

l'1,3-1,4- β -glucanasa sobre la mateixa mescla, que és capaç de transglicosidar aquest nou tetrasacàrid amb el disacàrid cel·lobiòsid **3** mitjançant un enllaç β -1,4 i lliurar quantitativament l'hexasacàrid **5**, Gal β 4Glc β 4Glc β 3Glc β 4Glc β 4Glc β -

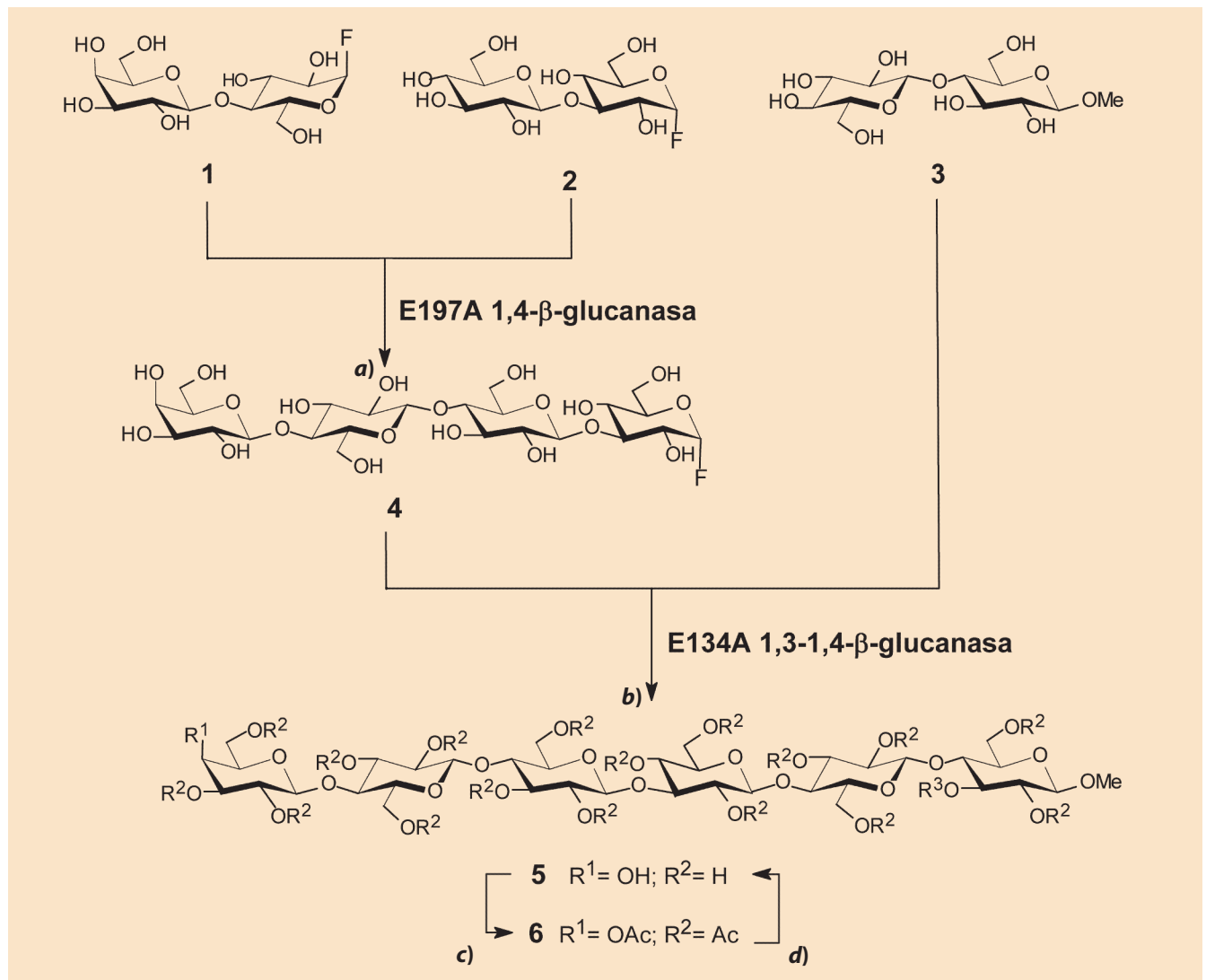


FIGURA 5. Síntesi de l'hexasacàrid **5**, Gal β 4Glc β 4Glc β 3Glc β 4Glc β 4Glc β -OMe, amb les glicosintases E197 de l'1,4- β -glucanasa i E134A de l'1,3-1,4- β -glucanasa. (a, b) tampó fosfat pH 7, CaCl₂ 0,1 mM, 35 °C, (c) Ac₂O/piridina, 24 h, temperatura ambient, (d) MeONa/MeOH, 4 h, temperatura ambient.

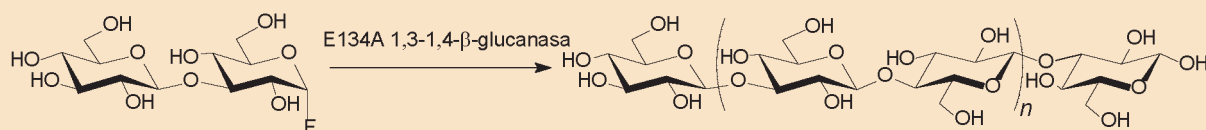


FIGURA 6. Reacció de polimerització catalitzada pel mutant E134A de l'1,3-1,4- β -glucanasa a partir del disacàrid fluorur de α -laminaribiosil.

obre les portes a la preparació de nous oligosacàrids funcionals, tant per explorar les seves propietats com per a la seva producció.

AGRAÏMENTS

A. P. agraeix els projectes BIO2001-2064-C02-02 i BFU2004-06377-C02-02 del Ministeri de Ciència i Tecnologia, i 2001SGR00327 de la Generalitat de Catalunya. M. F. agraeix la beca doctoral durant 2000-2003 de l'Institut Danone.

BIBLIOGRAFIA

- «Carbohydrates and Glycobiology (2001)». *Science*, 291, núm. especial 5512, p. 2337-2376.
- COOK, G. M. W. (1995). A: MEYERS, R. A. [ed.]. *Molecular Biology Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*. Nova York: VCH Publishers Inc., p. 153-158.
- NAKAKUKI, T. (2002). *Pure & Appl. Chem.*, 74, p. 1245-1251.
- ALCALDE, M.; PLOU, F. J.; GÓMEZ, A.; MARTÍN, M. T.; BALLESTEROS, A. (1999). *Alimentación, Nutrición y Salud*, 6, p. 77-86.
- BIWER, A.; ANTRANIKIAN, G.; HEINZLE, E. (2002). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59 (6), p. 609-617.
- PALFRAMAN, R.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. (2003). *Anaerobe*, 8 (5), p. 287-292.
- RASTALL, R. A.; MAITIN, V. (2002). *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, p. 490-498.
- MONTERO, E.; ALONSO, J.; CANADA, F. J.; FERNÁNDEZ-MAYORALAS, A.; MARTÍN-LOMAS, M. (1997). *Carbohydr. Res.*, 305, p. 383-391.
- ALBAYRAK, N.; YANG, S. T. (2002). *Biotechnol. Bioeng.*, 77, p. 8-19.
- GÓMEZ DE SEGURA, A.; ALCALDE, M.; YATES, M.; ROJAS-CERVANTES, M. L.; LÓPEZ-CORTÉS, N.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F. J. (2004). *Biotechnol. Prog.*, 20 (5), p. 1414-1420.
- KOSHLAND, D. E. JR. (1953). *Biol. Rev.*, 28, p. 416-436.
- DAVIES, G. J.; HENRISSAT, B. (1995). *Structure*, 3, p. 853-859.
- MCCARTER, J. D.; WITHERS, S. G. (1994). *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4, p. 885-892.
- VANRANTWIJK, F.; OOSTEROM, M. W.; SHELDON, R. A. (1999). *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, 6, p. 511-532.
- FERNÁNDEZ-MAYORALAS, A. (1997). *Top. Curr. Chem.*, 186, p. 1-20.
- VIC, G.; CROUT, D. H. G. (1994). *Tetrahedron Asymm.*, 5, p. 2513-2516.
- USUI, T.; MATSUI, H.; ISOBE, K. (1990). *Carbohydr. Res.*, 203, p. 65-77.
- NAUNDORF, A.; CAUSSETTE, M.; AJISAKA, K. (1998). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, p. 1313-1317.
- MACKENZIE, L. F.; WANG, Q.; WARREN, R. A. J.; WITHERS, S. G. (1998). *J. Am. Chem. Soc.*, 120, p. 5583-5584.
- MALET, C.; PLANAS, A. (1998). *FEBS Lett.*, 440, p. 208-212.
- MAYER, C.; ZECHEL, D. L.; REID, S. P.; WARREN, A. J.; WITHERS, S. G. (2000). *FEBS Lett.*, 466, p. 40-44.
- MORACCI, M.; TRINCONE, A.; ROSSI, M. (2001). *J. Mol. Catal. B. Enz.*, 11, p. 155-163.
- NASHIRU, O.; ZECHEL, D. L.; STOLL, D.; MOHAMMADZADEH, T.; WARREN, A. J.; WITHERS, S. G. (2001). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40, p. 417-420.
- JAKEMAN, D. L.; WITHERS, S. G. (2002). *Can. J. Chem.*, 80, p. 866-870.
- OKUYAMA, M.; MORI, H.; WATANABE, K.; KIMURA, A.; CHIBA, S. (2002). *Biosci. Biotech. Biochem.*, 66, p. 928-933.
- FAIJES, M.; PÉREZ, X.; SAURA, M.; PLANAS, A. «New glycosynthase specificity by E383A mutant β -glucosidase from *Streptomyces* sp.» [En tràmit]
- PERUGINO, G.; TRINCONE, A.; GIORDANO, A.; OOST, J. van der; KAPER, T.; ROSSI, M.; MORACCI, M. (2003). *Biochemistry*, 42, p. 8484-8493.
- FORT, S.; BOYER, V.; GREFFEE, L.; DAVIES, G. J.; MOROZ, O.; CHRISTIANSEN, L.; SCHÜLEIN, M.; COTTAZ, S.; DRIGUEZ, H. (2000). *J. Am. Chem. Soc.*, 122, p. 5429-5437.
- LIESHOUT, J. van; FAIJES, M.; NIETO, J.; OOST, J. van der; PLANAS, A. (2004). *Archaea*, 1, p. 285-292.
- HRMOVA, M.; IMAI, T.; RUTTEN, S. J.; FAIRWEATHER, J. K.; PELOSI, L.; BULONE, V.; DRIGUEZ, H.; FINCHER, G. B. (2003). *J. Biol. Chem.*, 277 (33), p. 30102-30111.
- JAHN, M.; DAVIES, G. J.; WITHERS, S. G. (2003). *Can. Chem. Commun.*, 12, p. 1327-1329.
- FAIJES, M.; PÉREZ, X.; PÉREZ, O.; PLANAS, A. (2003). *Biochemistry*, 42 (45), p. 13304-13318.
- PLANAS, A. (2000). *Biochim. Biophys. Acta*, 1543, p. 361-382.
- MALET, C.; PLANAS, A. (1997). *Biochemistry*, 36, p. 13838-13848.
- VALLMITJANA, M.; FERRER-NAVARRO, M.; PLANELL, R.; ABEL, M.; AUSIN, C.; QUEROL, E.; PLANAS, A.; PÉREZ-PONS, J. A. (2001). *Biochemistry*, 40, p. 5975-5982.
- PÉREZ-PONS, J. A.; CAYETANO, A.; REBORDOSA, X.; LLOBERAS, J.; GUASCH, A.; QUEROL, E. (1994). *Eur. J. Biochem.*, 223, p. 557-565.
- FAIJES, M.; FAIRWEATHER, J. K.; DRIGUEZ, H.; PLANAS, A. (2001). *Chem. Eur. J.*, 7, p. 4651-4655.
- FAIJES, M.; IMAI, T.; BULONE, V.; PLANAS, A. (2004). *Biochem. J.*, 380, p. 635-641.