



SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE B-01
SUBCLASE D

No. 370.162

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: UNILEVER N.V.

RESIDENCIA: Museumpark 1, ROTTERDAM, Holanda.

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION
DE SUSTANCIAS ENZIMATICAMENTE ACTIVAS"

Prioridad: Patente luxemburguesa n.º 56.634 del 2-8-1968



1 Este invento se refiere a sustancias enzimáticamente activas, a un método para su preparación y a los procedimientos para el uso de estas sustancias para realizar reacciones enzimáticas in vitro.

5 Es conocida la forma de realizar reacciones químicas en medios acuosos, por ejemplo, in vitro por medio de enzimas. Sin embargo, la separación de los productos de reacción del enzima es con frecuencia difícil y el enzima solamente puede ser utilizado una vez, porque pierde la mayor parte de su actividad durante el proceso de separación.

10 En consecuencia, se ha sugerido fijar los enzimas a un soporte que sea insoluble en el medio en el que se lleva a cabo la reacción enzimática, que normalmente es acuoso. El material enzimático sobre soporte insoluble puede ser utilizado para llevar a cabo reacciones enzimáticas en forma discontinua, en las que el enzima y el substrato están mezclados y el sistema es normalmente agitado. También es posible realizar procesos enzimáticos de forma continua filtrando una solución de substrato a través de un lecho de material de soporte del enzima. Así la separación del enzima de la mezcla de reacción no presenta dificultades.

15 Se ha sugerido incorporar los enzimas a soportes de materia orgánica de elevado peso molecular, como los derivados de celulosa, por ejemplo. El material de soporte se disuelve en un disolvente orgánico o en una mezcla de disolventes a la que se ha añadido la preparación seca de enzimas, después de lo cual se separa el disolvente y se obtiene un material de elevado peso molecular en el



2 SEP. 1952

1 que están embebidos los enzimas.

También se ha sugerido preparar resinas sintéticas enzimáticamente activas, como resina de poliacrilamida, polimerizando la acrilamida en un medio que contenga un agente de reticulación y un catalizador de la polimerización, en presencia de un enzima.

Ambos métodos implican el uso de reactivos orgánicos que pueden afectar a la actividad o estabilidad del enzima y los métodos tienen sus propios inconvenientes específicos. Ambos tienen el inconveniente de que solamente una pequeña parte del enzima activo es realmente embebida de forma tal que no pueda ser arrastra por lavado.

El presente invento proporciona un gel de sílice acuoso en el que las preparaciones de enzimas son embebidas, procedimientos para la preparación del mismo y métodos para llevar a cabo reacciones enzimáticas del sistema gel acuoso de sílice/enzima. Una ventaja obtenida de acuerdo con el invento es que el enzima se encuentra permanentemente en un medio acuoso tanto durante la preparación del material a base de enzima y gel acuoso de sílice como durante su uso. Se entiende que el gel acuoso de sílice es una red constituida por tetraedros de SiO_4 que contiene una cantidad variable de agua que depende de la naturaleza del enzima que se está embebiendo. Este gel acuoso de sílice no debe ser confundido con el gel de sílice de bajo contenido en agua, que normalmente se obtiene secando gel acuoso de sílice a unos 120°C y que habitualmente tiene un contenido en agua inferior al 10 % aproximadamente, determinado por ignición a 1200°C . Este gel de sílice de bajo contenido en agua es llamado apropiadamente xerogel de sílice.

2 SEP 1954



1

Las preparaciones de enzimas son cualquier enzima o combinación de enzimas en estado disuelto, dispersado, suspendido, emulsionado o seco, así como los enzimas que se presentan en partículas, tales como los enzimas combinados en partículas, organelas celulares, fragmentos de células, células liofilizadas o deshidratadas, células residuales de bacterias, hongos y levaduras. También están incluidos en esta definición los microorganismos que se utilizan en condiciones en las que no se produce un crecimiento activo.

10

Las preparaciones de enzimas contaminadas con enzimas proteolíticos que de otra forma desintegrarían el enzima pueden ser embebidas con éxito y retener su actividad.

15

El método de acuerdo con el invento es especialmente adecuado para incorporar enzimas que se presentan en partículas en el gel acuoso de sílice. Algunas preparaciones de enzimas que pueden ser embebidas en gel de sílice son, por ejemplo, esterasa de acetilcolina, quimotripsina, fosfatasa alcalina, catalasa, lipoxidasa y enzima sintetizador de prostaglandina.

20

Con objeto de evitar la descomposición de la preparación enzimática por los microorganismos, pueden agregarse agentes de preservación, por ejemplo tetraciclinas, en una etapa apropiada de la preparación o uso.

25

En una realización del invento, los enzimas son embebidos en el gel acuoso de sílice por gelificación de un sol acuoso de sílice en presencia de una preparación de enzimas.

30

Las condiciones empleadas durante la preparación de los enzimas embebidos pueden variar dentro de amplios



1 límites y dependen fundamentalmente de la estabilidad de
la preparación de enzimas que ha de ser embebida. Como es
sabido, la estabilidad de los diversos enzimas frente a
5 los productos químicos y frente al calor varían de unos a
otros. Con algunos enzimas puede ser necesario observar
precauciones especiales con objeto de obtener su actividad
y así puede ser conveniente realizar la preparación del en-
zima embebido en una atmósfera de gas inerte y/o a baja tem-
peratura.

10 Con tal de que las condiciones como pH, temperatu-
ra, etc, sean adecuadas para el enzima embebido, la prepa-
ración de gel acuoso de sílice/enzima, que normalmente tie-
ne un aspecto semejante a la jalea, puede ser solidificada
15 más por deshidratación y después puede recibir la forma de-
seada, por ejemplo por granulación, secado por atomización
o por revestimiento, aplicación a brocha o atomización de
otros objetos con la misma. Así, también es posible reali-
zar la gelificación del sol de sílice que contiene la pre-
paración de enzimas, en presencia de un soporte apropiado
20 como piedra pomez, plástico poroso, perlas de vidrio poro-
so, etc, de forma que la preparación de gel acuoso de sí-
lice/enzima se deposita sobre el soporte o en su interior.
Si se emplea un material poroso, la deposición del sistema
de sol de sílice/enzima puede ser efectuada sobre las pare-
25 des de los tubos capilares mediante la elección adecuada
de la concentración de sílice y gelificación subsiguiente
para formar el gel acuoso de sílice/enzima.

30 Una forma preferida de deshidratar ciertas prepa-
raciones de gel acuoso de sílice/enzima sin pérdida de ac-
tividad enzimática es expulsar el agua del gel por presión



1 en un cilindro de acero entre dos papeles de filtro, sostenidos por discos de acero poroso. De esta forma se obtiene un producto homogéneo de manera rápida y reproducible.

5 La deshidratación de la preparación de gel acuoso de sílice/enzima no debe ser continuada más allá de un contenido en agua para el cual la actividad enzimática se reduce bruscamente. A un contenido en agua del 10 %, calculado sobre el SiO_2 del sol acuoso de sílice, la actividad enzimática de la mayoría de las preparaciones de enzimas embebidos en gel de sílice ha desaparecido prácticamente.

10 El sol acuoso de sílice puede ser preparado por varios métodos conocidos, por ejemplo reacción de silicato alcalino con un ácido, mediante resinas cambiadoras de ion que separan los iones alcalinos del silicato, hidrólisis de un compuesto organosilícico, etc.

15 Los soles de sílice que contienen partículas primarias de un tamaño relativamente uniforme pueden ser obtenidos haciendo reaccionar un ácido y un silicato en condiciones cuidadosamente controladas. Esto puede suponer la calefacción de una solución diluida de silicato a $60-100^\circ\text{C}$, neutralización con ácido a un pH de 8-10,7 y posterior adición simultánea de más silicato y más ácido, en proporciones tales que el pH se mantenga dentro de los límites antes fijados.

25 De esta forma se producen soles de sílice con partículas primarias de tamaño uniforme, que oscila entre unos pocos y varios centenares de nanómetros ($1 \text{ nanometro} = 10^{-9}$ metros). Por gelificación de estos soles, se obtienen geles acuosos de sílice en los que las partículas primarias están entrelazadas de tal manera que se forman jaulas bastante

30



1 uniformes, cuyo tamaño depende del tamaño de las partículas primarias. Así, el tamaño de las jaulas entre las partículas primarias puede ser ajustado al tamaño de la preparación de enzima que ha de ser embebida.

5 La gelificación del sol acuoso de sílice puede tener lugar espontáneamente pero en general es conveniente acelerarla, lo que puede hacerse por varios métodos, por ejemplo adición de pequeñas cantidades de electrolitos (sales) y ajuste del pH de acuerdo con la preparación de enzimas a embeber.

10 Cuando se prepara el sistema de gel acuoso de sílice/enzima, no es necesario añadir la preparación de enzimas antes de que se inicie la gelificación del sol de sílice. Esto también puede ser realizado mientras está teniendo lugar la gelificación. Con objeto de obtener un enzima que esté satisfactoriamente embebido en el gel acuoso de sílice, debe ser agregado antes de que la gelificación tenga lugar hasta un punto demasiado avanzado y la agitación se haga también difícil.

20 Se ha encontrado que las preparaciones de gel acuoso de sílice/enzima pueden ser utilizadas repetidas veces para efectuar procesos enzimáticos, por ejemplo por agitación de la preparación de gel de sílice en una solución del substrato, optativamente en presencia de los co-factores apropiados y posterior recuperación de la preparación de gel de sílice/enzima, que puede haber retenido su actividad para otras operaciones posteriores, a partir del producto de la conversión enzimática.

25 Además, se ha encontrado que estos procesos enzimáticos pueden ser efectuados pasando una solución de un subg



1 trato a través de columnas formadas por o que contengan la pre-
paración de gel acuoso de sílice/enzima, optativamente en
mezcla con diluyentes de volumen inertes adecuados, sien-
do el grado y la velocidad de conversión función de los pa-
5 rámetros de la columna y de la velocidad de paso a través
de dicha columna. El uso de columnas de enzimas tiene la
ventaja de que, debido al principio del flujo, la concentra-
ción de sustancia reaccionante, puede mantenerse en un va-
lor óptimo.

10 El uso de preparaciones de gel acuoso de sílice/en-
zima depositadas sobre la superficie o en el interior de
un material poroso en columnas es especialmente ventajoso
en lo que se refiere a la velocidad de paso. Pueden efectuar-
se conversiones en múltiples etapas del substrato utilizan-
15 do una combinación de enzimas embebidos en gel acuoso de
sílice o mediante una combinación de preparaciones indepen-
dientes de enzima/gel de sílice, ya sea en una columna o en
varios lechos o columnas consecutivos. Las preparaciones
de gel acuoso de sílice/enzima de acuerdo con el invento
20 presentan una buena estabilidad en almacenamiento y pueden
ser utilizadas con fines sintéticos y analíticos. Especial-
mente la producción de compuestos saborizantes puede ser
realizada de una forma eficaz.

25 Los sistemas de gel acuoso de sílice/enzima de
acuerdo con el invento y su preparación y uso presentan
las siguientes características interesantes:

- 30 1. Los enzimas pueden ser incorporados, por ejemplo, en es-
tado disuelto o disperso, por lo tanto no hay necesidad
de convertirlos en la forma seca antes de ser embebidos,
lo que supondría pérdida de la actividad enzimática.



2 SEP

1
5
10
15
20
25
30

2. El sistema de gel acuoso de sílice/enzima, aunque fuertemente hidratado, puede ser manipulado fácilmente como una sustancia sólida o semi-sólida, mientras que los microalrededores de los enzimas embebidos se parecen mucho al agua que es el medio natural de los enzimas donde habitualmente presentan su actividad máxiam.
3. Los sistemas de gel acuoso de sílice/enzima se preparan en ausencia de reactivos orgánicos utilizando condiciones suaves, como temperaturas ambiente, adición de pequeñas cantidades de electrolitos (sales), condiciones de pH comprendidas normalmente entre 5 y 8, con lo que la gelificación del sol de sílice puede realizarse dentro de un periodo que varía entre algunos minutos y varias horas.
4. Con el gel acuoso de sílice, la cantidad de agua incorporada puede ser ajustada dentro de amplios límites comprendidos entre 10 y 5000 % de agua, calculado sobre el peso de SiO₂ (en el último caso también se obtiene una masa rígida), exactamente para cumplir los requisitos del enzima y del sustrato.
5. El gel acuoso de sílice tiene una estructura "abierta" es fácilmente accesible a las moléculas de sustrato de un amplio intervalo de pesos moleculares.
6. La red de gel de sílice está constituida por partículas esféricas entrelazadas (partículas primarias) que pueden variar entre algunas milimicras y varios centenares de milimicras. El tamaño de las jaulas varía con el tamaño de las partículas primarias y, por lo tanto, puede ser ajustado de forma que se obtenga una preparación de actividad óptima.



1 Preparación de sol de sílice

5 Se introducen 100 ml de agua tridestilada en una
vasija provista de los electrodos de una unidad de valoración
automática. Con intensa agitación se añade ácido clor-
hídrico 2N, 520 ml en total, a caudal constante, sobre el
10 agua destilada; al mismo tiempo se obtiene una solución de
vidrio soluble mezclando 260 ml de vidrio soluble de 41° Be,
relación molar $\text{Na}_2\text{O}:\text{SiO}_2 = 1:3,42$, y se agregan 240 ml de
agua tridestilada, medidas en una unidad de valoración auto-
mática (Radiometer Copenhagen TTT₁), de tal forma que el
pH en la vasija se mantenga en un valor constante de 1,6.
La temperatura se mantiene en el valor ambiente.

15 El sol de sílice transparente obtenido, conteniendo
8,2 % de SiO_2 y $\pm 4,7$ % de NaCl, es dializado en un tubo de
diálisis de celofán, de 28 mm de diámetro (Kalle A.G.,
Wiesbaden, Biebrich, Alemania) frente a una corriente cons-
tante de ácido clorhídrico diluido de pH 1,6 durante 20 ho-
ras aproximadamente. Por cada carga de 1,3 litros de sol
de sílice se aplica un total de 100-120 litros de ácido clor-
hídrico diluido. Después de la diálisis, el sol contiene
20 5,5-6,5 % de SiO_2 y alrededor de 0,02 % de NaCl. Almacenan-
do el sol a 0°C no se forma ningún precipitado gelatinoso
hasta que no han transcurrido de 4 a 5 semanas.

EJEMPLO 1

25 Se disuelven 3,8 mg de una preparación de esterasa
de acetilcolina (Sigma Chem., St. Louis, Mo., U.S.A.) en 1
ml de agua. Se disuelven 25 mg de fosfato potásico dihidró-
geno en 25 ml de un sol de sílice recién preparado (se ob-
tiene en la forma antes descrita) y se ajusta el pH a 7,5.
30 Entonces se añade rápidamente el enzima disuelto a 9,4 g del



2

1 sol de sílice, después de lo cual la mezcla gelifica. La
preparación de gel acuoso de sílice/enzima así obtenida
contiene 0,365 mg de esterasa de acetilcolina por gramo
de preparación. La actividad enzimática de la preparación
5 de gel acuoso de sílice/enzima se determina de la siguiente
forma:

Se comprimen 2 g de la preparación de gel a través
de un tamiz (anchura de malla, 0,1 mm) y se agregan a 11 ml
de una solución reguladora de fosfato 0,01 M (pH 7,4) en
10 una vasija provista de los electrodos de una unidad de va-
loración automática y después se añaden 3 ml de una solu-
ción acuosa 0,2 M de cloruro magnésico. El pH de la mezcla
se ajusta a 7,4 hasta que permanece constante. Esto tiene
que hacerse varias veces debido a la capacidad de intercam-
15 bio del gel de sílice. A continuación se añaden 0,5 ml de
una solución acuosa 0,055 M de hidrocioruro de acetilcolina
(que es convertido por el enzima en ácido acético e hidro-
cloruro de colina). El ácido acético formado se valora me-
diante una unidad de valoración automática con solución
20 acuosa 0,02 N de hidróxido sódico y la actividad de la es-
terasa de acetilcolina se determina como consumo de hidró-
xido sódico expresado en equivalentes gramo por minuto. Com-
parando la actividad así determinada con la actividad de
1 mg del material enzimático de partida en estado disuel-
25 to, se determina la actividad relativa del material enzi-
mático embebido. Se halla una actividad relativa del 62 %.
Con objeto de investigar si se produce absorción o más bien
oclusión, el sistema de gel acuoso de sílice/enzima se en-
juaga en una solución acuosa al 2 % de hidrocioruro de me-
30 tilamina (que es normalmente utilizado para desorber las



1 protefnas absorbidas) y a continuación se lava tres veces
con porciones de la solución reguladora 0,01 M de fosfato.
En la preparación de gel acuoso de sílice/enzima se pre-
5 senta una actividad relativa del 58 % cuando se compara
con el material enzimático de partida. Además, una canti-
dad de 1,6 g de gel acuoso de sílice preparado en la forma
antes descrita de este ejemplo, sin embargo en ausencia
del enzima, es agitada durante 1½ horas en una solución
de 2 mg de la preparación de partida de esterasa de acetil-
10 colina en 4 ml de agua. Una vez interrumpida la agitación,
la mezcla se centrifuga. El líquido que sobrenada contiene
1,48 mg de material enzimático activo, determinado a par-
tir de la actividad y el gel acuoso de sílice se lava tres
veces con porciones de la solución reguladora 0,01 M de fos-
15 fato. El gel acuoso de sílice presenta entonces una acti-
vidad enzimática correspondiente a 0,05 mg del enzima.

El enzima embebido en sílice, preparado de acuerdo
con este experimento, se compara con el mismo enzima pero
ahora embebido con un gel de acrilamida preparado a partir
20 de los siguientes ingredientes:

- Solución A: 40 g de acrilamida en 100 ml de solución regu-
ladora 1/10 N de fosfato, pH 7,4.
- Solución B: 2,3 g de N,N'-metilen-bis(acrilamida) en 100 ml
de solución reguladora de fosfato, pH 7,4.
- 25 Solución C: 3 mg de riboflavina en 10 ml de solución regu-
ladora 1/10 N de fosfato, pH 7,4
- Solución D: 3 mg de $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$ en 10 ml de solución regulado-
ra 1/10 N de fosfato, pH 7,4.
- 30 Solución E: 6 mg de esterasa de acetilcolina en 1 ml de so-
lución reguladora de fosfato, pH 7,4.



1 calculado sobre SiO_2). El gel es deshidratado cuidadosamente
en un mortero y tamizado. De la fracción tamizada con unas
dimensiones comprendidas entre 0,6 y 0,25 mm se separan los
finos por lavado y decantación. Se llena un tubo de 7 mm
5 de diámetro interno con 3,5 g de las partículas, conteniendo
por lo tanto 1,77 mg como máximo de la preparación de
esterasa de acetilcolina. Esta columna se mantiene a 25°C
con ayuda de un termostato. Se hace pasar por la columna
una solución de sustrato. Esta solución está constituida
10 por 0,33 mg/ml de hidrocloruro de acetilcolina en solución
reguladora 0,01 M de fosfato, pH 7,4, conteniendo 8 mg/ml
de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y (contra el crecimiento de los microorganismos)
100 mg/litro de oxitetraciclina y 1 ml/l de suspensión
de pimafucina (2,5 %).

15 Durante la experiencia, la solución de reserva se
mantiene por encima de 0°C y solo se calienta cuando entra
en la columna.

A una velocidad de 75 ml/hora, se convierte el 80 %
del hidrocloruro de acetilcolina. Reduciendo la velocidad
20 de paso a 37,5 ml/hora, se convierte la totalidad del sustrato.
Esta columna es utilizada constantemente durante 4
días, durante cuyo tiempo no se observa ninguna pérdida de
actividad.

EJEMPLO 1b

25 En la forma descrita en el Ejemplo 1, se añaden
6,8 mg de esterasa de acetilcolina a 9 ml de sol de sílice
(ajustado a pH 7,4) y esta mezcla se agrega sobre 3,12 g
de piedra pomez (diámetro de las partículas, alrededor de
3 mm) contenida en una vasija evacuada, después de lo cual
30 se restablece la presión atmosférica con objeto de llenar



1 todos los poros de la piedra pomez con la mezcla de enzima/
sol.

La parte que no es retenida por los poros se sepa-
ra en la trompa de agua sobre un filtro de vidrio. Todas
5 estas operaciones se realizan antes de que la mezcla de
sol/enzima gelifique.

La piedra pomez retiene 2,48 g de sol (conteniendo
1,69 mg de preparación de enzima). Después de galificar,
las partículas se introducen en una columna que se utiliza
10 en la forma descrita en el Ejemplo 1a. A una velocidad de
bombeo de 18 ml/hora se convierte el 85 % del sustrato. Es-
ta actividad es constante durante el tiempo de la experien-
cia, que es de 5 días.

EJEMPLO 2

15 En 100 ml de sol de sílice dializado, preparado de
acuerdo con el método descrito anteriormente, se disuelven
200 mg de KH_2PO_4 y el pH se ajusta a 3-4 mediante la adi-
ción de una solución 4 N de NaOH. A continuación se añaden
30 mg de tripsina (de Koch-Light, Colnbrook, Bucks., Inglate
20 rra), disueltos en 5 ml de solución acuosa 10^{-3} N de ácido
clorhídrico y el pH de la mezcla resultante se ajusta a
8,0 mediante una nueva adición de NaOH 4 N. Después de va-
rios minutos se ha formado un gel sólido y firme (conteni-
do en SiO_2 , 5,2-6,2 %).

25 La actividad en tripsina de este sistema de gel/en-
zima se determina de la siguiente forma: Se comprimen 2 g
del gel a través de un tamiz con mallas de 0,1 mm de diáme-
tro y a continuación se añaden 15 ml de una solución regula
dora 0,01 M de fosfato (una solución de 680 mg de KH_2PO_4 en
30 1 litro de agua tridestilada, ajustada a pH 8,0 mediante la



1 adición de NaOH 0,1 N). Debido a la actividad cambiadora
de ion del gel de sílice, el pH del sistema no permanece
constante. Por lo tanto, el pH se ajusta con agitación con-
tinua hasta que este valor permanece constante en 8,0. A
5 continuación se añaden 100 mg de éster etílico de N- α -ben-
zoylarginina (BAEE), disueltos en 0,5 ml de la solución re-
guladora de fosfato antes mencionada. La tripsina activa
hidroliza este éster, formando ácido libre. La actividad
se mide en un termostado de agua valorando continuamente
10 el ácido con una solución 0,0025 N de NaOH, empleando una
unidad de valoración automática colocada a pH 8,0 y mante-
niendo la temperatura constante en 25⁰C con un termostato.
El consumo de NaOH por minuto proporciona una medida de la
actividad de la preparación, que se expresa en equivalentes
15 gramo por minuto y por gramo de preparación. Debido a la
actividad cambiadora de ion del gel acuoso de sílice, el
pH es perturbado de nuevo después de la adición del BAEE y
la velocidad de consumo de NaOH tiene que ser determinada
después de haber añadido ya una cierta cantidad de NaOH.
20 Esta cantidad de NaOH se determina de la misma forma en un
experimento en blanco, realizado con una cantidad igual de
gel acuoso de sílice en ausencia de enzima. La actividad de
la preparación se compara con la de una cantidad de enzima
disuelto igual a la embebida en el gel de sílice. De esta
25 forma se obtiene una actividad relativa de 55-65 %.

El sistema de gel/enzima así obtenido se deshidrata
después a vacío sobre ácido sulfúrico concentrado hasta apro-
ximadamente el 15 % del peso original del gel (alrededor del
200 % de agua, calculado sobre SiO₂). Las partículas granu-
30 ladas sólidas así obtenidas pueden ser utilizadas como ta-



1 les. Con objeto de determinar la actividad en condiciones
normales, se pulveriza una cierta cantidad en un mortero y
se pasa a través de un tamiz con mallas de 0,1 mm. La acti-
vidad se determina en la forma antes descrita. Al parecer
5 durante la deshidratación no se pierde actividad. También
después de lavar los gránulos varias veces con agua trides-
tilada o con la solución reguladora antes mencionada, pare-
ce que la actividad no ha disminuído.

Se realiza una comparación de la estabilidad a 25°C
10 de la tripsina disuelta con la de la tripsina antes menciona-
da embebida en gel de sílice acuoso, de la siguiente mane-
ra: Se prepara una solución de reserva de tripsina en HCl
10⁻³ N, conteniendo 1 mg de material enzimático por ml. Es-
ta solución es estable durante varias horas y se utiliza en
15 el siguiente experimento:

A una solución de 100 mg de BAEE en 15 ml de solu-
ción reguladora de fosfato (0,01 M) a pH 8,0 se añaden 0,2
ml de solución de tripsina en el momento t = 0. La veloci-
dad de conversión se determina en la forma antes mencionada
20 y se encuentra que se convierte en 5,7 x 10⁻⁴ equivalentes
gramo de BAEE por minuto.

En los cuatro experimentos siguientes se repite el
procedimiento; sin embargo, se añaden a la solución regula-
dora 0,2 ml de solución de tripsina. Después de unos interva-
25 los de tiempo variables de 3, 15, 45 y 60 minutos respecti-
vamente, se agregan 100 mg de BAEE y se determina la veloci-
dad de conversión. Los valores encontrados están en la si-
guiente tabla:

30



	<u>Periodo de reacción enzimática después de t = 0 (minutos)</u>	<u>Velocidad de conversión, equivalentes gramo/minuto</u>
1	0	$5,7 \times 10^{-4}$
	3	$4,5 \times 10^{-4}$
5	15	$4,0 \times 10^{-4}$
	45	$3,5 \times 10^{-4}$
	60	$3,2 \times 10^{-4}$

Además, la velocidad de conversión de 150 mg del gel acuoso de sílice parcialmente deshidratado conteniendo tripsina embebida se determina después de haber añadido 15 ml de solución reguladora de fosfato (véase la determinación de actividad descrita anteriormente). Se encuentra una velocidad de conversión de BAEE de $5,1 \times 10^{-4}$ equivalentes gramo/minuto. El sistema de gel acuoso de sílice/enzima se separa por filtración y en una experiencia similar posterior se convierte otra cierta cantidad de BAEE. La actividad encontrada es de $4,9 \times 10^{-4}$ equivalentes gramo/minuto que permanece casi constante en las siguientes conversiones. El procedimiento se repite después de dejar en reposo durante 1 y 2 horas el sistema original de gel acuoso de sílice/tripsina y se observan las mismas velocidades de conversión.

En un ejemplo comparativo, se incluyen 6 mg de tripsina en un gel de poliacrilamida en la forma descrita en el Ejemplo 1. Aunque esta preparación presenta una actividad relativa del 74 % aproximadamente, esta actividad disminuye por lavado hasta alrededor del 7 %, conteniendo el fluido de lavado aproximadamente el 68 % de la actividad.

En la forma descrita en el Ejemplo 1 se realiza una comparación incluyendo 10 mg de tripsina en una membrana de



1 nitrato de celulosa. Después de lavar la misma, la mayor
parte de la actividad se encuentra en el fluido de lavado,
presentando la membrana menos del 0,5 % de la actividad.

EJEMPLO 3

5 En la forma descrita en el Ejemplo 2 se embeben 300
mg de tripsina en gel acuoso de sílice, en lugar de los 30
mg mencionados en el Ejemplo 2. El sistema gel acuoso de
sílice/enzima presenta alrededor del 70 % de la actividad
10 de la tripsina utilizada en la preparación del gel. El gel
así obtenido también puede ser deshidratado sin nueva pér-
dida de actividad hasta alrededor del 15 % del peso de gel
correspondiente al 300 % de agua, calculado sobre SiO₂.

EJEMPLO 4

15 Como se describe en el Ejemplo 2, se prepara un sis-
tema de gel de sílice/tripsina a partir de solamente 2 mg
de tripsina, en lugar de los 30 mg mencionados en el Ejem-
plo 2 y se deshidrata hasta el 20 % del peso original del
gel (que contiene alrededor del 300 % de agua, calculado
sobre SiO₂). El gel deshidratado es pulverizado cuidadosa-
20 mente en un mortero y tamizado. Mediante lavado y decanta-
ción se separan los finos de la fracción tamizada con dimen-
siones comprendidas entre 0,6 y 0,25 mm. Se llena un tubo
de 7 mm de diámetro interno con 3 g de las partículas, con-
teniendo así como máximo 0,33 mg de tripsina, hasta una al-
25 tura del lecho de 7 cm. Esta columna se mantiene a 25°C con
ayuda de un termostato. Se hace pasar a través de la colum-
na, a una velocidad de 1,2 ml/minuto, una solución de 1 mg/
ml de éster etílico de N- α -benzoilarginina (BAEE) en solu-
ción reguladora 0,01 M de fosfato, pH 8 (en la que se han
30 disuelto 400 mg de SiO₂ por litro, neutralizando la canti-



1 dad calculada de vidrio soluble). La solución de BAEE que
atraviesa la columna se convierte por completo en el tiempo que dura la experiencia, que es de 72 horas. En este periodo se convierten en total alrededor de 5 g de BAEE.

5

EJEMPLO 5

Se disuelven 30 mg de $MgSO_4$ (anhidro) en 25 ml de sol de sílice dializado, obtenido en la forma antes descrita. La solución se ajusta a pH 7 con solución 4 N de NaOH, después de lo cual se añaden 30 mg de fosfatasa alcalina (de Koch-Light Colnbrook, Bucks., Inglaterra) disueltos en 6 ml de una solución reguladora "tris" (esta solución reguladora "tris" se obtiene disolviendo en 1 litro de agua 0,01 moles de tri(hidroximetil)aminometano ("tris") y 0,01 moles de $MgSO_4$ (anhidro); ajustando el pH a 8,8 con ácido acético). La mezcla gelifica y al cabo de $\frac{1}{2}$ hora la masa rígida se tritura con ayuda de una espátula y se lava a fondo con la solución reguladora "tris" antes mencionada. La masa lavada pesa 29,3 g y por lo tanto contiene teóricamente 1,2 mg de enzima por gramo de gel. El gel lavado se comprime a través de un tamiz con una anchura de malla de 0,1 mm.

10

15

20

25

30

La actividad de la preparación de gel/enzima se determina de la forma siguiente: Como substrato se toma una solución 0,01 M de fenilfosfato disódico en la solución reguladora "tris" antes mencionada. Se introducen 5 ml de esta solución y 2 g de las partículas lavadas y trituradas en un tubo provisto de un tapón de vidrio esmerilado. El tubo con su contenido se hace girar lentamente de forma continua con objeto de efectuar una buena mezcla del contenido. Después de 10 minutos exactamente, se añaden 2 ml de solución



1 0,4 N NaOH para detener la reacción y el gel de sílice se
separa por centrifugación. La cantidad de fenol formado se
determina midiendo la absorción ultravioleta a 278 nanome-
5 to analítico a varias cantidades conocidas de fosfatasa ál-
calina disuelta, puede ser determinado el contenido en enzi-
ma activo de las partículas de gel de sílice; esto corres-
ponde al 70 % de la cantidad de enzima que debía encontrar-
se presente teóricamente en la muestra.

10 EJEMPLO 6

Se forma una preparación de gel de sílice/lipoxidasa
por el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, pero se di-
suelven 7 mg de lipoxidasa (de Sigma Chem., St. Louis, Mo.,
USA) en 5 ml de solución reguladora (solución 0,05 M de
15 NH_4Cl y NH_4OH de pH 9). La actividad de la preparación de
gel de sílice/lipoxidasa así obtenida se determina de la
siguiente forma:

El gel se comprime a través de un tamiz (tamaño de
20 malla, 0,1 mm). Se prepara una solución de substrato a par-
tir de 198 mg de ácido linoleico puro, que por mezcla gra-
dual de 2,05 ml de NH_4OH 1 N se transforma en una pasta
homogénea que se emulsiona en 98 ml de agua, en cuya emul-
sión se disuelven después 178 mg de NH_4Cl . Finalmente esta
emulsión se satura con oxígeno. Se introducen 2 g del gel
25 tamizado en un tubo con un tapón de vidrio esmerilado. Se
añaden 5 ml de substrato a $t = 0$ al gel, después de lo cual
el tubo se sacude continuamente. Después de 5 minutos exac-
tamente, se agita el tubo con 5 ml de butanol, después de
lo cual su contenido se centrifuga para obtener una separa-
30 ción rápida en dos fases. De la fase superior (fase butanó-



1 lica) se pipetea 2 ml que se diluyen con 6 ml de metanol.
En esta solución se mide la absorción ultravioleta a 234 mμ
nometros cuya absorción es una medida de la concentración
del sistema de dieno conjugado formado. Aplicando el mis-
5 mo procedimiento analítico a varias soluciones patrón cono-
cidas de lipoxidasa en una solución reguladora 0,05 M de
NH₄Cl-NH₄OH a pH 9,0 y representando la cantidad de lipoxi-
dasa frente a la extinción a 234 nanómetros, es posible, por
interpolación gráfica del valor encontrado para la lipoxi-
10 dasa embebida en el gel acuoso de sílice, determinar el por-
centaje de actividad retenido por el enzima. Se encuentran
valores de 50-60 % de la actividad original.

EJEMPLO 7

15 Se forma una preparación de enzima sintetizadora de
prostaglandina (PGSE) de la forma siguiente:

Se homogeinizan a 0°C 25 g de glándulas vesiculares
frescas de cordero, separando el tejido conector y la gra-
sa, primero en una mezcladora doméstica (Turmix) y después
en un homogeinizador Bühler en 50 ml de solución regulado-
20 ra 0,1 M de fosfato (pH 7,5). Este homogeneizado se centri-
fuga a 10.000 g (g = gravedad) durante 15 minutos a 2-3°C.
El líquido que sobrenada se decanta y se centrifuga durante
1 hora a 100.000 g. Este segundo centrifugado, que contiene
el PGSE, se seca por congelación. El rendimiento es alrede-
25 dor de 2 g, constituidos por 30 % aproximadamente de pro-
teína. Se emulsionan 100 mg de esta preparación, que debe
ser considerada como una preparación enzimática combinada
en partículas, en 5 ml de solución reguladora de fosfato
0,1 M (pH 7,5). Se enfrían 20 ml de sol de sílice prepara-
30 do en la forma antes descrita a 0°C y el pH se ajusta a 6



1 con NaOH. Después se añade rápidamente la emulsión de enzimas a este sol de sílice.

Después de esta adición se ajusta el pH de la mezcla a 7,5, después de lo cual se gelifica la mezcla.

5 De la preparación de gel así obtenida, se añaden 2 g (correspondientes a 2 mg de proteína) a 2 ml de solución reguladora de fosfato (pH = 7,5, 0,1 M) a la que se han agregado 0,6 mg del co-factor glutation (Gamma-L-glutamyl-L-cisteinil-glicina), 0,1 mg del substrato ácido dihomo-gamma-
10 linolénico (siendo la totalidad ácido cis-8, 11, 14-eicosatrienoico) y 0,1 mg de hidroquinona. Esta mezcla de preparación de gel de sílice acuosa/enzima y la solución saturada con aire y conteniendo el substrato se agita durante 15 minutos a 35°C, después de lo cual se interrumpe la reacción
15 por acidulación con ácido cítrico hasta un pH inferior a 3. A continuación la mezcla se agita tres veces con porciones de 1 ml de éter dietílico. Se recogen las capas etéreas, se combinan y se lavan con agua hasta que la reacción de la solución etérea es neutra. Después se evapora la solución
20 etérea y el residuo se recoge en 1 ml de metanol. Se introducen 0,1 ml de esta solución en una célula de cuarzo de 1 cm, junto con 2,4 ml de metanol y 0,5 ml de KOH 3 N en metanol acuoso (conteniendo 75 % de metanol). Después de unos 5 minutos, se determina la cantidad de prostaglandina E₁
25 formada a partir del aumento de la absorción ultravioleta a 237 nanómetros, debido a la conversión de PGE₁ en PGE₁ 237. Cuando se compara con 2 mg de proteína de la misma preparación de PGSE en 2 ml de solución reguladora, mantenida a 0°C, la preparación de enzima embebido en gel de
30 sílice ha retenido el 50 % de su actividad.



EJEMPLO 8

1 En la forma descrita en el Ejemplo 1 se embebe una
cantidad de una preparación de ureasa (de SIGMA, St. Louis,
Mo. USA) en gel acuoso de sílice (pH 8). Después de la ge-
5 lificación, la preparación de gel/enzima se deshidrata has-
ta el 12,5 % del peso original (que contiene alrededor de
150 % de agua, calculado sobre SiO₂). El producto resul-
tante contiene 41 mg de la preparación de ureasa por gramo.

Después de pulverizar y tamizar la muestra en partí-
10 culas menores de 0,1 mm, se determina por valoración la ac-
tividad enzimática de la preparación de gel acuoso de sílice/
enzima de forma análoga a la descrita en el Ejemplo 1. La
solución reguladora utilizada es solución 0,1 M de fosfato
(pH 8,0) en lugar de 0,01 M a pH 7,4 utilizada en el Ejem-
15 plo 1 y el substrato es formado por 300 mg de urea en 3 ml
de solución reguladora, en lugar del hidrocloreuro de acetil-
colina del Ejemplo 1. El amoniaco formado se valora a pH
constante con HCl 0,2 N. Aunque a pH 8,0 solamente se valo-
ra alrededor de la mitad del amoniaco formado, como conse-
20 cuencia del dióxido de carbono también formado, la actividad
de la preparación de ureasa puede ser expresada de esta for-
ma en equivalentes gramo/minuto, que evidentemente no es una
medida absoluta. Comparando la actividad así determinada con
la actividad de 1 mg del material enzimático de partida en
25 estado disuelto, se determina la actividad relativa del en-
zima embebido. Se encuentra una actividad relativa del 40 %
aproximadamente. La actividad no se altera lavando a fondo
varias veces las partículas de gel/enzima con la solución re-
guladora empleada.



EJEMPLO 9

1 En la forma descrita en el Ejemplo 4 se prepara una
columna de 4,2 g de partículas de gel/ureasa, que contienen
alrededor de 20 mg de preparación de ureasa por gramo. De es
ta forma la columna contiene unos 84 mg de ureasa. Se pasa
5 por la columna una solución de 10 mg/ml de urea en solución
reguladora 0,1 M de fosfato (pH 8,0), saturada con SiO₂ en
la forma descrita en el Ejemplo 4. A una velocidad de 150 ml/
hora, se convierte alrededor del 77 % de la urea; a una velo
cidad de 75 ml/hora se convierte el 100 %.

EJEMPLO 10

10 Se embebe en hidrogel de sílice una preparación de ca-
talasa (de Koch-Light Colnbrook, Bucks, Inglaterra), en la
forma descrita en el Ejemplo 1.

15 La preparación obtenida contiene alrededor de 1 mg
de la preparación de enzima por gramo. La preparación de
gel/enzima se tritura y se lava a fondo. La actividad enzi-
mática de la preparación de gel de sílice/enzima se deter-
mina de la forma siguiente:

20 Una cantidad adecuada de partículas menores de 0,1 mm
se agrega a unos 10 ml de solución reguladora 0,1 M de fosfa-
to (pH 7,0) exenta de aire. Se agregan 0,2 ml de H₂O₂ al
0,3 % y se mide la disminución de la concentración de H₂O₂
por un método conocido, con ayuda de un sistema de electro-
dos de platino y calomelanos, mientras se elimina continua-
mente el O₂ producido haciendo burbujear N₂ a través del me-
dio de reacción.

25 La concentración de H₂O₂ se representa logarítmicamen-
te y se obtiene una línea recta. La pendiente de esta línea,
expresada en segundos⁻¹, se utiliza como una medida de la
30 actividad de las preparaciones. Para la llamada "Katalase-



1 fähigkeit", véase, por ejemplo, "Enzymes", M. Dixon y E.C.
Webb, Longmans London (1964) pag. 16. Comparando la acti-
vidad con la de 1 mg del material enzimático de partida, se
encuentra una actividad relativa del 20 % aproximadamente,
5 que permanece constante también después de otro lavado a
fundo.

EJEMPLO 11

Se suspenden 1,8 g de esporas húmedas de Penicillium
roqueforti en una solución salina fisiológica hasta un vo-
lumen total de 7 ml.
10

Se agrega 1 ml de esta suspensión conteniendo alre-
dedor de 10^{10} esporas a 4,5 ml de sol de sílice (ajustado
a pH 7,0), después de lo cual se deja que la mezcla se ge-
lifique. El gel de sílice así obtenido se tritura con una
15 espátula y se lava tres veces con 10 ml de solución regu-
ladora (fosfato 0,01 M a pH 7). Las partículas lavadas se
introducen en un frasco de 100 ml con tapón de vidrio. Se
añaden 20 ml de una solución de sustrato constituida por
1 g/litro de solución de ácidos grasos en solución tampón
acuosa 0,01 M de fosfato (pH 7); los ácidos grasos están
20 formados por 19,0 % de ácido acético, 18,8 % de ácido butí-
rico, 11,2 % de ácido caproico, 10,6 % de ácido caprílico,
19,6 % de ácido cáprico y 21,4 % de ácido láurico.

De acuerdo con la bibliografía, ésta es una buena
25 composición media de ácidos grasos exentos de C_{20-12} que
aparecen en el queso azul escandinavo y en el queso Roque-
fort, representando 1 g de ácidos grasos alrededor de 250 g
de queso. En condiciones asépticas, la mezcla de ácidos gra-
sos/solución reguladora y preparación de gel de sílice/en-
30 zima se agita suavemente a la temperatura ambiente; al ca-



1 bo de 18 horas se observa el intenso olor de las metilcetonas, pareciéndose mucho la percepción de sabor global al característico del queso Roquefort.

5 Las partículas que contienen esporas se separan por centrifugación y en el líquido que sobrenada se analizan las metilcetonas. Se encuentran las siguientes cantidades (por cromatografía de gases), indicando las cifras entre paréntesis el porcentaje de los ácidos grasos correspondientes con vertidos:

10 2-heptanona 5,25 mg/l (4,8 % sobre ácido caprílico)
2-nonanona 6,50 mg/l (3,2 % sobre ácido cáprico)
2-undecanona 0,35 mg/l (0,2 % sobre ácido láurico)

15 En el líquido que sobrenada no se encuentran esporas y las incluidas en las partículas de gel de sílice no germinan dentro del tiempo de duración del experimento.

En un experimento correspondiente empleando la misma cantidad de esporas pero sin gel de sílice, se encuentran las siguientes cantidades de metilcetonas:

20 2-heptanona 8,45 mg/l (7,7 % sobre ácido caprílico)
2-nonanona 4,95 mg/l (2,5 % sobre ácido cáprico)
2-undecanona 0,35 mg/l (0,2 % sobre ácido láurico)

25 También se ha encontrado que es posible preparar de forma continua estos sabores a queso empleando una columna de esporas embebidas en sílice a través de la cual se filtra la solución de substrato.

EJEMPLO 12

30 Se suspenden 5 g de material celular húmedo de Cla-
dospori butyri en una solución salina fisiológica, siendo el volumen total de 10 ml, conteniendo alrededor de 9×10^{10} células por ml. De la misma forma descrita en el Ejemplo 11,



1 se incluye 1 ml de esta suspensión en un hidrogel de sílice,
2 que después se tritura y lava y se mezcla con 20 ml del
3 mismo substrato utilizado en el Ejemplo 11. Ya después de
4 agitar suavemente durante 20 minutos la mezcla obtenida, se
5 percibe claramente el olor a queso. Al cabo de 18 horas, se
6 separan las partículas de gel por centrifugación y se deter-
7 minan las metilcetonas formadas.

8 Se encuentran las siguientes cantidades (por cromatografía de gases):

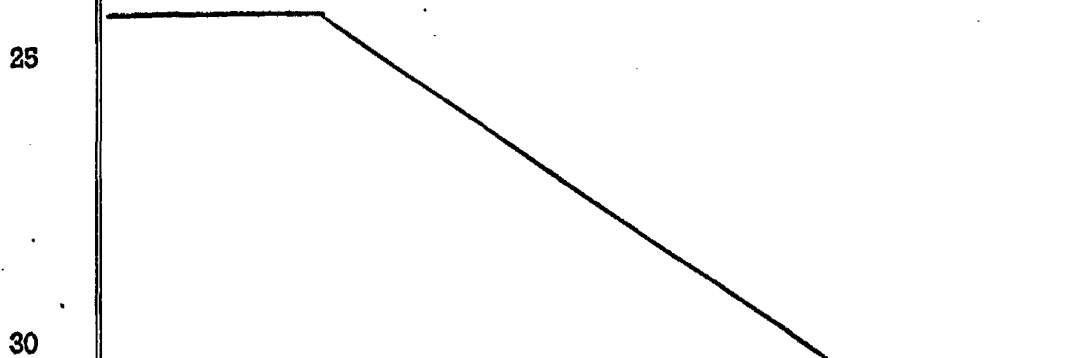
10	2-heptanona	30,5 mg/l
	2-nonanona	9,3 mg/l
	2-undecanona	0,1 mg/l

11 En el líquido que sobrenada no se encuentran células
12 y las incluidas en las partículas de gel de sílice no ger-
13 minan dentro del tiempo que dura el experimento.
15

14 En un experimento correspondiente empleando la misma
15 cantidad de células pero sin gel de sílice, se encuentran
16 las siguientes cantidades:

17	2-heptanona	31,0 mg/l
20	2-nonanona	17,5 mg/l
	2-undecanona	1,1 mg/l

18 En resumen, la Patente de Invención que se solicita
19 recaerá sobre las siguientes:





1 ABR. 1971

1

REIVINDICACIONES

5

1. Un procedimiento para la preparación de sustancias enzimáticamente activas, caracterizado por preparar un gel acuoso de sílice en presencia de una preparación de enzimas.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por gelificar un sol acuoso de sílice en presencia de una preparación de enzimas.

10

3. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por preparar un gel acuoso de sílice en una solución que contiene enzimas en forma de partículas.

4. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por preparar un gel acuoso de sílice en una solución que contiene enzimas en estado disuelto.

15

5. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado por preparar un gel acuoso de sílice/enzima en presencia de un soporte poroso.

20

6. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque el gel acuoso de sílice/enzima es deshidratado hasta un contenido en agua no inferior al 10% del agua, calculado sobre el peso de SiO_2 .

25

7. Un procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque el proceso de deshidratación se realiza en combinación con medidas que comunican la forma deseada a la preparación de gel acuoso de sílice/enzima.

30

8. Un procedimiento según las reivindicaciones anteriores en el que para realizar procesos enzimáticos se pasa una solución de un substrato adecuado a través de una columna de gel acuoso de sílice/enzima.



- 1 A

1
5
10
15
20
25
30

9. Un procedimiento según las reivindicaciones anteriores en el que para realizar procesos enzimáticos se mezcla un sistema de gel acuoso de sílice/enzima enzimáticamente activo, con una solución de un substrato seleccionado para ser convertido enzimáticamente por el enzima, manteniendo la mezcla durante un tiempo previamente determinado, preferiblemente con agitación y separando de la solución la preparación de gel de sílice/enzima:

10. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE SUSTANCIAS ENZIMATICAMENTE ACTIVAS".

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva, que consta de treinta páginas mecanografiadas.

Madrid, 1 de agosto de 1969.

BERNARDO UNGRIA.

P.P.