

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE C-07 C-11
SUBCLASE G D

A-61
K

P.- 42.517

3.3. 0A/5502-

670



37074A

Memoria descriptiva

para solicitar PATENTE DE INVENCION

por 20 años

a nombre de N.V. ORGANON

entidad / ~~de nacionalidad~~ holandesa

con domicilio en Kloosterstraat 6, Oss, Holanda.

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE CONJUGADOS DE ENZIMA SOLUBLES EN AGUA, ESTABLES" (Clase Internacional A61k)

6.9.69



Es un hecho conocido la copulación de enzimas con polímeros insolubles mediante enlaces covalentes para obtener conjugados de enzimas insolubles. En un estudio publicado en Ann. Rev. Biochemistry 35 (II), 873 (1966),
5 I. Silman y E. Katchalski describen la preparación de estos conjugados de enzimas. Algunas veces se utilizan polímeros solubles en agua como vehículos, los cuales se reticulan mediante reactivos bifuncionales de tal manera que finalmente se obtienen de nuevo derivados de enzimas insolubles. Un ejemplo bien conocido de los mismos es la copu-
10 lación de tripsina con el copolímero de etileno anhídrido del ácido maleico y la reticulación del producto de la copulación con hexametildiamina, descrita por E. Katchalski en Biochemistry 3, 1905 (1964).

15 Las enzimas modificadas de este modo son importantes si se quiere utilizar una y la misma preparación de enzima para varias conversiones enzimáticas, ya que después de la conversión el derivado de enzima insoluble puede separarse de la mezcla de reacción y utilizarse para la con-
20 versión siguiente. Las enzimas modificadas a conjugados insolubles son más estables que las enzimas sin modificar. Esta modificación es especialmente importante si se utilizan enzimas relativamente costosas.

25 En muchos casos, no obstante, es deseable utilizar conjugados de enzimas solubles. Los productos textiles, por ejemplo, no pierden el apresto en absoluto por la acción de una α -amilasa insoluble porque sobre un soporte sólido, por ejemplo algodón, el substrato, por ejemplo almidón, no puede reaccionar con la enzima insoluble o lo hace
30 sólo en pequeño grado. Además, las enzimas unidos a un so-



porte sólido tienen sólo una velocidad de conversión muy lenta en comparación con las enzimas en solución. La proteasa insoluble tampoco producirá mucho efecto en la separación de manchas de proteínas de las fibras textiles.

5 Por otra parte, la forma estable y soluble se preferirá frecuentemente a la forma insoluble para fines terapéuticos y cosméticos.

También es conocida la obtención de conjugados de enzimas solubles por reticulación. En Biopolymers 5,
10 577-582 (1967), R.P. Patel y otros describen la preparación de conjugados solubles en agua de quimotripsina con poli(ácido acrílico), poli(ácido glutámico) y carboximetilcelulosa (CMC). La reticulación con los dos polímeros mencionados en primer lugar se lleva a cabo por medio del reactivo
15 K de Woodward, aplicándose la CMC en la forma de su azida. Únicamente en unos pocos casos pudo considerarse suficiente el rendimiento de actividad obtenido por la copulación. El grado de reticulación fué muy bajo. Acerca de la estabilidad de los conjugados independientes no se dispone de datos.
20

Resumen de la Invención

Se ha encontrado ahora un procedimiento para la preparación de conjugados de enzimas estables y solubles en agua por formación de enlaces covalentes con compuestos
25 que contienen varios grupos reactivos, caracterizado por el hecho de que se hacen reaccionar una enzima y un hidrolizado de proteínas junto con estos compuestos reactivos para obtener conjugados solubles con un rendimiento de actividad mucho mayor en comparación con los métodos conocidos.
30 Estos conjugados exhiben una estabilidad satisfactoria



contra la desnaturalización térmica. Además, son estables en un campo de pH que es más amplio que el de la enzima original, tanto en la región ácida como en la básica. Se ha encontrado además que estas enzimas son especialmente resistentes contra la acción de los detergentes. Todas estas propiedades hacen muy adecuados los presentes conjugados para uso en agentes para lavado de ropas y en composiciones líquidas para la limpieza de superficies y para preparaciones farmacéuticas y cosméticas tales como ungüentos y lociones.

Por el término "hidrolizado de proteínas" se entiende uno o más aminoácidos o péptidos, o mezclas de los mismos. Las últimas pueden obtenerse, por ejemplo, por hidrólisis de proteínas. Esta hidrólisis puede efectuarse por cualquier método convencional, p.ej., con un ácido o un enzima.

Como proteínas están particularmente cualificadas las siguientes sustancias: caseína, sero-albúmina, lactoglobulina, albúmina de huevo, fibroína, miosina, queratina, colágeno, gelatina, proteínas de soja y mezclas de proteínas crudas.

El hidrolizado de proteínas tiene una acción protectora de la enzima en el procedimiento de reticulación, cuyo mecanismo es sin embargo desconocido. En los conjugados de enzimas en cuestión, que tienen un contenido considerable de péptidos o amino-ácidos, las últimas sustancias demuestran tener una influencia favorable sobre la conservación de la estructura de la enzima, en particular de las estructuras denominadas terciarias y cuaternarias como se describe en, por ejemplo, Angew. Chem. 78, 217 (1966).



La destrucción de estas estructuras se denomina desnaturación. Se produce fácilmente, por ejemplo, a temperaturas elevadas y por la acción de sustancias químicas tales como detergentes, oxidantes y medios fuertemente ácidos ó básicos. Como la actividad depende en gran parte de la conservación de estas estructuras, se supone que en los conjugados en cuestión los péptidos y aminoácidos fijan firmemente estas estructuras. En los conjugados de acuerdo con la invención, la presencia del hidrolizado de proteínas no afecta en ningún aspecto desfavorablemente a la actividad de la enzima.

El compuesto con el que se reticulan la enzima y el hidrolizado de proteínas debe ser preferiblemente un polímero reactivo soluble en agua, el cual se puede formar a partir de un monómero reactivo o de un polímero no-reactivo activado de una manera convencional. Es también posible, sin embargo, utilizar otros compuestos bifuncionales tales como aldehidos, di-aldehidos, aldehidos insaturados, y ésteres de ácidos carboxílicos halogenados. Los agentes de reticulación solubles más adecuados son: poli(ácido acrílico), activado, por ejemplo, con 3'-sulfonato de N-etil-5-fenil-isoxazolio (reactivo K de Woodward), la azida de carboximetilcelulosa, etileno-anhídrido del ácido maleico, poli(ácido glutámico), activado con reactivo K de Woodward, formaldehído, tioformaldehído, dextranas sustituidas con grupos isotiocianicos, derivados del ácido dimetil adípico, aldehído glutárico, carbodiimidas y cloruro de fenol-2,4-disulfonilo, bromuro de cianógeno, polisacáridos activados por bromuro de cianógeno, aldehído crotónico, acroleína y ésteres clorofórmicos, o una mezcla



de estos agentes.

La reacción de reticulación se lleva a cabo a un pH comprendido entre 4 y 10,5, dependiendo de la enzima y del reactivo aplicado, pero se prefiere emplear un pH comprendido entre 5 y 8. La reacción comienza ya inmediatamente por encima del punto de solidificación, por ejemplo a 4°C, pero entonces es de tal larga duración que, por ejemplo, se requieren de 20 a 48 horas para una reticulación adecuada. Por ello, la reacción se efectúa preferiblemente a una temperatura superior, pero no se presenta problema alguno de desnaturalización térmica de la enzima.

El método de acuerdo con la invención puede aplicarse en la conjugación de muchas enzimas tales como redoxasas, por ejemplo, catalasa, y también hidrolasas tales como proteasas, amilasas, lipasas, así como transferasas, liasas, isomerasas y ligasas, o mezclas de estas enzimas.

Se ha encontrado además que el procedimiento de acuerdo con la invención permite obtener productos con una buena estabilidad si se utilizan enzimas hidrolíticos tales como amilasas, amiloglucosidasas, estearasas, lipasas, ribonucleasas y proteasas. El último grupo se ensayó especialmente en agentes para lavado de ropas. Incluso los detergentes y oxidantes no desnaturalizan en gran manera los conjugados de enzimas de una proteasa microbiana procedente de un Bacilo y un hidrolizado de proteínas preparados por este método a una temperatura de 60°C aproximadamente.

Los hidrolizados obtenidos por la acción de la misma proteasa que ha de estabilizarse, especialmente los hidrolizados de caseína preparados de este modo, son muy útiles en la conjugación de proteasas con estos hidrolizados.

10 SEP



La combinación de aldehído glutárico como agente de reticulación, e hidrolizado de caseína como agente protector, ha demostrado ser extremadamente útil en la preparación de conjugados de proteasa.

5 Dependiendo de la naturaleza de la enzima, del agente de reticulación y del hidrolizado de proteína, se aplican diferentes relaciones de mezclado. En conjugados compuestos de proteasa, hidrolizado de caseína y aldehído glutárico, la relación en peso entre proteasa y aldehído
10 glutárico está comprendida preferiblemente entre (1-5): (5-1), siendo la proporción en peso de hidrolizado de la misma magnitud que la del agente de reticulación. Prefe-
 riblemente, la relación entre las cantidades de enzima, hidrolizado de proteína y aldehído glutárico es aproxima-
15 damente de 2:1:1.

Descripción de las Realizaciones Preferidas

La invención se ilustra además por los siguientes ejemplos, a los cuales no se limita en absoluto, sin embargo.

20 Ejemplo I

 Se disolvieron 0,5 g de una proteasa microbiana en 75 ml de tampón 0,05 M de fosfatos de pH 6,5. Se añadieron a esta solución 25 ml de una suspensión de 1 g de anhídrido del ácido etileno maleico (E.M.A.,) grado 11,
25 Monsanto) en agua. Se agitó la suspensión durante 16 horas a 5°C y se dializó después. Se separó luego un residuo insoluble de la suspensión por centrifugación, después de lo cual se liofilizó la suspensión para obtener 1,13 g de producto final soluble. De una manera idéntica se
30 preparó un conjugado de enzima soluble, excepto que la

6.9.69



reticulación tuvo lugar después de la adición de 1 g de hidrolizado de albúmina. Se dializó y liofilizó la suspensión para obtener 1,4 g de derivado de enzima soluble.

5 La tabla que se da a continuación muestra el rendimiento de actividad y la estabilidad de los dos conjugados de enzima, y una comparación con las propiedades de estabilidad del enzima original.

	Antes	<u>Después de la Reticulación</u>		
	de la	<u>Sin hidroliza</u>	<u>Con hidroliza</u>	
	<u>reticu</u>	<u>do de albúmina</u>	<u>do de albúmina</u>	
	<u>lación</u>			
10	Actividad (U/mg)	0,46	0,07	0,20
	Rendimiento de actividad	(100%)	35%	98%
15	Actividad residual después de 60 minutos de calentamiento a 60°C en tampón TRIS 0,1M de pH 9,0	28%	40%	65%
20	Actividad residual después de 60 minutos de calentamiento a 60°C en 0,4% de una solución de una composición de agente de lavado de ropa a pH de 8,7 x)	<10%	42%	62%
25	Actividad residual después de 15 minutos de calentamiento a 60°C en 0,4% de una composición de agente de lavado de ropa que contiene perborato a pH de 8,7 xx)	<10%	38%	76%

30



- 5 x) Composición del agente de lavado de ropa:
- 30% de tripolifosfato sódico
 - 30% de sulfato sódico
 - 25% de carbonato sódico
 - 5% de dodecilbenceno sulfonato sódico
 - 5% de éter de poliglicol
 - 5% de carboximetilcelulosa, blanco óptico, etc.
- 10 xx) Composición del agente de lavado de ropa que contiene perborato:
- 28% de tripolifosfato sódico
 - 17% de sulfato sódico
 - 6% de detergente aniónico
 - 4% de detergente no-iónico
 - 22% de perborato sódico
 - 16% de un agente de suspensión de la suciedad (CMC), etc.
 - 7% de humedad
- 15

20 La actividad proteolítica se determinó espectrofotométricamente a 280 nm midiendo la absorbancia de los péptidos, que son solubles en ácido tricloroacético, después de la hidrolisis de la caseína, como describe M. Kunitz en J. Gen. Physiol. 30, 291 (1947). Tiempo de incubación: 30 minutos a 35°C y a pH 8,0

25 De acuerdo con la invención, se obtiene un conjugado de enzima soluble con una estabilidad muy superior en comparación con un conjugado preparado sin hidrolizado de albúmina, y el producto se obtiene con un rendimiento mucho más alto. Merece subrayarse la mayor estabilidad del conjugado de acuerdo con la invención en el caso de los

30 detergentes que contienen perborato.



Ejemplo 2

Se disolvieron 100 mg de una quimotripsina de ganado bovino purificada en 10 ml de tampón de acetato sódico, 0,2M de pH 4,5. Se añadieron a esta solución 2 ml de una solución al 8% de hidrolizado de caseína. El hidrolizado de caseína se preparó hidrolizando una solución de caseína al 4% con una proteasa bacteriana durante 20 horas a 35°C y a pH 9,0. Después de la hidrólisis, el producto obtenido se calentó durante 5 minutos a 100°C con objeto de destruir la actividad proteolítica, liofilizándose a continuación.

A la solución obtenida se añadieron 200 mg de aldehído glutárico (en forma de solución al 25%) a la temperatura ambiente y con agitación. Al cabo de 30 minutos, se enfrió la mezcla de reacción a 4°C y se dializó a esta temperatura contra agua destilada, liofilizándose después.

Se preparó del mismo modo un conjugado de enzima sin hidrolizado de caseína durante la reacción. Las propiedades del conjugado de enzima se muestran en la tabla siguiente.

	<u>Después de la Reticulación</u>		
	<u>Antes de la Reticulación</u>	<u>Sin hidrolizado de caseína</u>	<u>Con hidrolizado de caseína</u>
Rendimiento de Actividad	(100%)	< 2%	12%
Actividad residual después de 30 min. de calentamiento a 50°C en tampón de fosfato 0,1 M de pH 7,8	25%	indeterminable	74%



La actividad de la quimotripsina se determinó a pH de 7,8 y a 30°C por valoración continua del ácido formado después de la hidrólisis del éster etílico de la N-benzoiltirosina.

5

Ejemplo 3

80 mg de bromuro de cianógeno, disueltos en 5ml de agua destilada, se añadieron a una solución de 200 mg de una proteasa bacteriana en tampón de fosfato 0,5 M de pH 8,0 mientras que se agitó a 20°C.

10

En un segundo experimento, 1,25 ml de una solución de hidrolizado de caseína al 8%, preparada como se describe en el ejemplo 2, se añadieron a la misma mezcla de reacción.

15

Al cabo de 20 horas de tiempo de reacción se dializaron y liofilizaron las mezclas de reacción. El rendimiento y la estabilidad de los conjugados de enzima obtenidos se muestran abajo.

20

	Antes de la Reticulación	<u>Después de la reticulación</u>	
		Sin hidrolizado de caseína	Con hidrolizado de caseína
Rendimiento de actividad	(100%)	8%	21%
Actividad residual después de 20 min de calentamiento a 60°C en tampón TRIS 0, 1M de pH 8,0	14 %	69%	87%
Idem después de 20 min de calentamiento a 60°C en 0,4% de una composición de agente de lavado de ropa (véase ejemplo 1) a pH 8,0	9%	30%	30%

30



Ejemplo 4

En este ejemplo se utilizó como compuesto reactivo polifuncional el producto reactivo de una mezcla de bromuro de cianógeno y dextrana, obtenido del modo siguiente.

Se disolvieron 400 mg de dextrana (peso molecular 10.000 aproximadamente) en 20 ml de agua destilada. Se añadieron a esta solución 80 mg de bromuro de cianógeno. Durante la reacción, se mantuvo un pH de 11,0-11,5 por adición continua de hidróxido sódico 1N. Al cabo de 10 minutos de reacción se añadió el derivado de dextrana reactivo obtenido a 200 mg de una proteasa bacteriana disuelta en 5ml de tampón de fosfato 0,5 M de pH 8,0, con agitación.

En dos experimentos paralelos se añadieron previamente 1,25 ml de hidrolizado de caseína al 8% y 1,0 ml de solución de glicina al 4%, respectivamente, a la solución de proteasa. Al cabo de 20 horas de tiempo de reacción a la temperatura ambiente, las soluciones se dializaron y liofilizaron.

Los resultados se dan en la tabla siguiente.

	<u>Después de la reticulación</u>			
	<u>Antes de la reticulación</u>	<u>sin adición al- guna</u>	<u>con hidrolizado de caseína</u>	<u>con glicina</u>
Rendimiento de actividad	(100%)	79%	120%	98%
Actividad residual después de 20 min de calentamiento a 60°C en tampón TRIS 0, 1M de pH 8,0	14%	26%	25%	24%
Idem en 0,4% de una composición de agente para lavado de ropa (véase ejemplo 1 a pH 8,0.	9%	16%	16%	15%

19 NOV 1969

EJEMPLO 5

Se disolvieron 0,5 g de una proteasa microbiana en 75 ml de tampón de fosfato 0,5M de pH 6,5. Se añadieron a esta solución 25 ml de una solución que contenía 0,125 g de aldehído glutárico.

En un segundo experimento, se añadieron previamente 0,25 g de ácido glutárico a la solución de proteasa.

Se agitaron ambas soluciones durante 16 horas a 52°C y se dializaron luego. Se separó un residuo insoluble por centrifugación y se liofilizó el líquido sobrenadante para obtener, respectivamente, 0,72 y 0,75 g de conjugados de enzimas dializados y liofilizados.

En la tabla siguiente se da una comparación.

		<u>Después de la reticulación</u>		
		<u>Antes de la reticulación</u>	<u>Sin ácido glutámico</u>	<u>Con ácido glutámico</u>
15	Rendimiento de actividad	(100%)	< 3%	30%
	Actividad residual después de 60 min. de calentamiento a 60°C en TRIS 0,1 M de pH 9,0	10%	indeterminable	50%
20	Idem después de 30 min. de calentamiento a 60°C en 0,4% de una composición de agente de lavado de ropa (véase ejemplo 1) a pH 9,0	< 10%	indeterminable	60%
25				

EJEMPLO 6

Se disolvieron 250 mg de una preparación de amiloglucosidasa purificada (24 U/mg) en 20 ml de tampón TRIS 0,1 M a pH 8,0. Se añadieron a esta solución 12,5ml de una solución de hidrolizado de caseína al 8% en tampón



TRIS 0,1 M de pH 8,0. El hidrolizado de caseína se preparó hidrolizando enzimáticamente caseína a pH 8,0 por medio de una proteasa microbiana.

5 A la solución obtenida se añadieron 0,5 g de azida de CMC disueltos en 40 ml de tampón TRIS 0,1 M de pH 8,0. La azida de CMC soluble se preparó conforme se indica en Nature 189, 576 (1962). Se agitó la solución a la temperatura ambiente durante 16 horas. Seguidamente se dializó y liofilizó la preparación obtenida, para obtener 1,60 g de
10 producto seco con una actividad de 3,75 U/mg.

De la misma manera se preparó una composición sin hidrolizado de caseína. En lugar de este hidrolizado se utilizaron 12,5 ml de tampón TRIS 0,1 M de pH 8,0. Rendimiento: 0,59 g de producto seco con una actividad de
15 9,15 U/mg.

La actividad de las preparaciones de amiloglucosidasa se midió por determinación espectrofotométrica de la cantidad de glucosa liberada en la hidrólisis del almidón soluble, después de colorear con o-toluidina (K. Dubowski, J. Clin. Chem. 8, 215 (1962) a 635 nm. Tiempo de incubación: 20 15 minutos a 40°C y a un pH de 4,5.

En la Tabla siguiente, se comparan los rendimientos de actividad y la estabilidad de los productos obtenidos con los del material de partida.

25

	<u>Después de la reticulación</u>		
	<u>Antes de la reticulación</u>	<u>Sin hidrolizado de caseína</u>	<u>Con hidrolizado de caseína</u>
Rendimiento de actividad	(100%)	90%	100%
30 Actividad residual después de 15 minutos de calentamiento a 70°C en tampón de acetato sódico 0,1 M de pH 4,5	29%	41%	47%



La estabilidad mejorada del conjugado de amiloglucosidasa se presenta también claramente por sí misma en la aplicación de esta preparación a la fabricación de dextrosa a partir del almidón.

5 El hecho es que se ha demostrado que es posible alcanzar el mismo grado de hidrólisis (valor E.D.) con una dosis de conjugado de enzima preparado de acuerdo con este ejemplo e igual a la del enzima no reticulado, pero en un tiempo más corto que con enzima no-reticulado, o en el caso
10 del mismo tiempo de hidrólisis se puede conseguir un grado de hidrólisis mayor como se ha explicado anteriormente en esta Memoria.

Se pre-hidrolizó una solución de almidón al 30% con una ~~A~~amilasa hasta un valor E.D. de 12 aproximadamente.
15 Después se hidrolizó más la solución con diversas cantidades de amiloglucosidasa y conjugado de amiloglucosidasa preparadas de acuerdo con este ejemplo, a pH 4,0 y 60°C. Terminada la hidrólisis, se determinó el equivalente de dextrosa (valor E.D., esto es, el porcentaje de glucosa
20 formado referido a la cantidad máxima de glucosa obtenible teóricamente) midiendo el contenido de glucosa de acuerdo con Somogyi-Nelson, descrito en J Biol. Chem. 195, 19 (1952).

	Valor E.D.	
	<u>Amiloglucosidasa</u>	<u>Conjugado de amiloglucosidasa</u>
25		
	Dosis 2,5 U/g almidón, tiempo de hidrólisis: 48 horas	88,0
	Dosis 2,5 U/g almidón, tiempo de hidrólisis: 60 horas	92,1
	Dosis 3,5 U/g almidón, tiempo de hidrólisis: 48 horas	93,8
30	Dosis 3,5 U/g almidón, tiempo de hidrólisis: 60 horas	94,2
		96,4
		96,2
		96,6



Ejemplo 7

Se preparó una solución de 200 mg de una proteasa bacteriana en 20 ml de tampón TRIS 1 M de pH 8 con y sin 240 mg de hidrolizado de caseína.

5 Se preparó también una solución de 200 mg de la proteasa bacteriana reticulada con 1000 mg de aldehído glutárico con y sin 240 mg de hidrolizado de caseína en 20 ml de tampón TRIS 1 M, manteniendo el pH de 8.

10 El rendimiento y la estabilidad mejorados resultantes de la aplicación del método inventado se deducen claramente de la tabla siguiente.

	<u>Antes de la re</u>		<u>Después de la reti</u>	
	<u>ticulación</u>		<u>culación</u>	
	<u>Sin hi</u>	<u>Con hi</u>	<u>Sin hidro</u>	<u>Con hidro</u>
	<u>droлиза</u>	<u>droлиза</u>	<u>lizado de</u>	<u>lizado de</u>
	<u>do de</u>	<u>do de</u>	<u>ca</u>	<u>caseína</u>
	<u>caseína</u>	<u>seína</u>		
Rendimiento de actividad (100%)		121%	62%	115%
Actividad residual después de permanecer a la temperatura ambiente x días:				
3 días	28%	52%	37%	79%
12 "	17%	38%	33%	74%
18 "	13%	28%	25%	64%

Ejemplo 8

25 Del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo 6,1 g de una mezcla cruda comercial de glucosa-oxidasa y catalasa se copuló por medio de carboximetilcelulosa con y sin hidrolizado de albúmina.

30 En la tabla dada abajo se comparan el rendimiento de actividad y las propiedades de estabilidad de los conjugados de enzima obtenidos. La actividad de la glucosa-



oxidasa se mide por determinación volumétrica de la cantidad de ácido glucónico liberada después de la incubación de una solución de glucosa con glucosa-oxidasa durante 15 minutos a pH 5,1 y a 35°C, como se describe por L. Underkofler en Proc. Int. Symp. Enzyme Chemistry Tokyo and Kyoto, pag. 486 (1957).

La actividad de la catalasa se determinó siguiendo la descomposición del peróxido de hidrógeno espectrofotométricamente a 240 nm a pH 7,0 y a 25°C, como se describe por Beers y Sizer en J. Biol. Chem. 195, 133 (1952).

		<u>Después de la reticulación</u>		
		<u>Antes de la reticulación.</u>	<u>Sin hidrolizado de albúmina</u>	<u>Con hidrolizado de albúmina</u>
15	Rendimiento de actividad, glucosa-oxidasa	(100%)	54%	72%
	Actividad residual, glucosa-oxidasa, después de 10 minutos de calentamiento a pH de 4,5 y a 80°C	22%	51%	55%
20	Rendimiento de actividad, catalasa	(100%)	62%	80%
	Actividad, residual, catalasa, después de 10 minutos de calentamiento a 80°C y a pH de 4,5	59%	85%	91%

25 Esta solicitud que corresponde a la presentada en Holanda el 31 de agosto de 1968, Nº 6812443 se acoge a los beneficios del artº 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.



REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años son los siguientes:

5

1.- Procedimiento para la preparación de conjugados de enzima solubles en agua, estables, por formación de uniones covalentes con compuestos que contienen grupos reactivos, caracterizado porque son hechas reaccionar conjuntamente una enzima y una proteína hidrolizada, con estos compuestos reactivos.

10

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el producto de partida es una enzima hidrolítica.

15

3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el producto de partida es una proteasa.

4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque es utilizada una proteína hidrolizada, obtenida por la acción de la misma proteasa a estabilizar.

20

5.- Procedimiento según una o más de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque es utilizada una caseína hidrolizada.

25

6.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque son hechas reaccionar proteasa y una caseína hidrolizada, con aldehído glutárico, a un pH comprendido entre 5 y 8.



14 MAY 1971

7.- Procedimiento según las reivindicaciones 3 y 5, caracterizado porque el producto de partida es una proteasa microbiana obtenida de un bacilo.

5 8.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque la relación entre las cantidades de enzima, proteína hidrolizada y aldehído glutárico es de 2:1:1, aproximadamente.

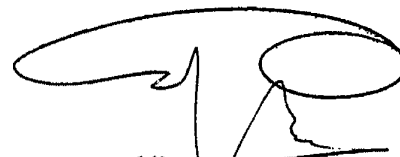
9.- PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE CONJUGADOS DE ENZIMA SOLUBLES EN AGUA, ESTABLES.

10 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de diez y nueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 14 MAY. 1971
p.a.

15


Alberto de Eizaguerre
Por Poderes