



10 ES	11 NUMERO	10 AI
	21 425.598	
	22 FECHA DE PRESENTACION	
	23-4-74	

P.- 57.408

PATENTE DE INVENCION

425.598

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
354.412	25-4-73	EE.UU.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	61 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C O F G	

64 TITULO DE LA INVENCION
"UN METODO DE PREPARAR UNA COMPOSICION DE UN SUSTRATO ENZIMATICO Y UN SOPORTE"

71 SOLICITANTE (S)
FOOD CONTROL AB.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Södergatan 12, 211 34 Malmö, Suecia.

75 INVENTOR (ES)
Kjell Gunnar BLIXT, Sven Ivan Arvid TORNMARCK, Rolf JUHLIN, Karl Rune SALENSTEDT y Mandayam TIRU.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ

lfg

POOR
QUALITY

1 Este invento se refiere a un sustrato para enzi-
mas, y más particularmente a un método de preparar una com-
posición que contiene un sustrato de esta clase que se apli-
ca y adsorbe firmemente a un soporte.

5 En la mayor parte de las reacciones enzimáticas,
es decir, reacciones en las cuales un sustrato por la ac-
ción catalítica de una enzima experimenta una modificación
(generalmente degradación), tanto el sustrato como la enzi-
ma están en forma de una solución y en algunos casos de una
10 suspensión. Se lograrán diversas ventajas, no solo respec-
to al transporte y manipulación, si cualquiera de los com-
ponentes, es decir la enzima o el sustrato, pueden suminis-
trarse sobre un soporte. Es conocido combinar una enzima
con un soporte, tal como un gel o celulosa.

15 También es conocido combinar un sustrato con un
soporte, pero la combinación en la técnica anterior ha si-
do realizada de tal modo que el sustrato estaba unido de mo-
do covalente al soporte por medio de un copulador, o el sus-
trato había sido aplicado únicamente de modo suelto a un so-
20 porte de modo que pueda separarse de él fácilmente, por
ejemplo por acción de agua. Como un ejemplo de la técnica
anterior puede mencionarse el artículo "Trägergebundene bio-
logisch aktive Substanzen und ihre Anwendung" por H.D. Orth
y W. Brummer en *angewandte Chemie*, volumen 84 (1972), nº 8,
25 páginas 319-368. Este artículo se refiere principalmente a
enzimas adsorbidas sobre soportes, pero en la Tabla 1 se ci-
tan diversas referencias que tratan de sustratos adsorbidos
sobre soportes. Es un hecho común a todos estos datos que
se refieren a sustratos que están unidos químicamente a so-
30 porte, es decir por enlace covalente o enlace iónico (aniónico).

1 nico). La intención es sacar partido de los sustratos adsor-
bidos sobre soportes para la preparación, en un estado pu-
ro, de enzimas. En este caso existe solamente una formación
de complejo enzima-sustrato sin ninguna degradación del sus-
5 trato. La memoria de la patente de EE.UU. 2.677.917 y la memo-
ria de la patente francesa 2.071.058 describen además como
es conocida la aplicación a soportes, tales como carbón ve-
getal o perlita expandida, de medios nutrientes para produc-
ción en abundancia de hongos. Los medios nutrientes utili-
10 zados son solubles en agua y permiten la producción abundan-
te de hongos para absorber el nutriente en un medio húmedo
para mantener el crecimiento. Una descripción correspondien-
te se hace en la memoria de la patente de EE.UU. 3.251.749
para conversión bacteriana en polisacáridos de hidratos de
15 carbono que están dispuestos sobre soportes. En este caso
también, el "sustrato" es soluble en agua y en cambio está
colocado de modo suelto sobre el soporte.

Como ejemplos adicionales de la técnica anterior
pueden mencionarse la memoria de la patente francesa
20 1.306.640 que describe la incrustación de enzimas o sustra-
tos enzimáticos en un material permeable, tal como un mate-
rial polímero. La memoria de la patente francesa 595.782
describe la aplicación de ácido sulfúrico a la tierra de
diatomeas. La memoria de la patente británica 891.467 des-
25 cribe la aplicación de una sustancia activa capaz de una
acción oxidante o reductora (quinona-hidroquinona), a di-
versos soportes. La memoria de la patente de EE.UU. 2.717.852
describe la aplicación de enzimas a soportes. La memoria de
la patente francesa 940.108 se refiere a cargas de refuerzo
30 para caucho, consistiendo dichas cargas en material mineral

1 de grano fino revestido con un agente tensioactivo o lubri-
cante, tal como aceite o grasa. La memoria de la patente de
EE.UU. 1.979.380 describe el revestimiento de partículas de
pigmentos, tal como negro de humo, con materia orgánica,
5 tal como aceite de linaza. La memoria de la patente britá-
nica 993.944 describe el revestimiento de silicato de sodio
y aluminio de gran superficie específica con un colorante.
La memoria de la patente de EE.UU. 2.354.318 describe el
revestimiento de carbonato de calcio de grano fino con un
10 adhesivo, estando destinado el producto como pigmento por
ejemplo en papeles de empapelar.

Contrariamente de lo que ha demostrado ser la téc-
nica anterior, el presente invento se refiere a un método
de preparar un tipo específico de sustratos adsorbidos so-
15 bre soportes, no estando unido el sustrato de modo covalen-
te al soporte ni directamente ni por copuladores, pero es-
tando anclado firmemente al soporte por adsorción debido a
la interacción entre el sustrato y un soporte especial de
gran superficie específica. Es además un requisito previo
20 del invento que el sustrato tenga una solubilidad baja en
agua y no experimente hidrólisis o disolución en ausencia
de la enzima correspondiente. Al contrario de algunas de
las enseñanzas de las memorias de la patentes antes mencio-
nadas, en las cuales el revestimiento es un material solu-
25 ble en agua aplicado de modo suelto, el sustrato en el con-
tenido del presente invento está adsorbido de este modo fir-
me sobre el soporte y además es difícilmente soluble en
agua. Por este medio, el invento proporciona de una forma
muy sencilla y nada cara un sustrato enzimático unido fir-
30 mamente a un soporte. Para la actuación del sustrato adsor

1 bido sobre un soporte se emplea una enzima en fase acuosa y debido a la naturaleza y las propiedades del sustrato adsorbido sobre un soporte se obtiene una afinidad elevada y fácil de controlar entre la enzima y el sustrato.

5 El invento proporciona por tanto un método de preparar una composición de un sustrato enzimático y un soporte, caracterizado porque un sustrato enzimático que es difícilmente soluble en agua y sustancialmente estable en ausencia de la enzima correspondiente y un soporte que es
10 inerte al sustrato enzimático y tiene una superficie específica de al menos $50 \text{ m}^2/\text{g}$ se suministran con agitación a un disolvente orgánico para la formación de una suspensión, después de lo cual se separa el disolvente orgánico y el residuo restante se tritura en partículas de tamaño deseado.

15 En una realización del invento se suministra además a la suspensión un diluyente miscible con el sustrato.

El diluyente se selecciona preferiblemente de los aceites minerales que contienen diversos hidrocarburos, alcoholes alifáticos superiores y poliglicoles.

20 En otra realización del invento puede suministrarse además a la suspensión un agente modificador de la viscosidad.

El agente modificador de la viscosidad puede ser un jabón de metal, por ejemplo estearato de aluminio.

25 En una realización adicional preferida del invento el soporte tiene una superficie específica de al menos $200 \text{ m}^2/\text{g}$.

30 El soporte se selecciona preferiblemente de polímeros orgánicos/inorgánicos, óxidos inorgánicos, ácidos y sales.

1 Específicamente se prefiere seleccionar el soporte de alúmina, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, aerogel de sílice y fosfato de calcio.

5 En una realización especial del invento el sustrato es tricaprionato de glicerina.

10 Un empleo especial de la composición sustrato-soporte obtenida por el método del invento es en el llamado indicador enzimático que comprende una composición, adsorbida sobre un soporte, de sustrato enzimático en combinación con una enzima correspondiente al sustrato, y un indicador para poner de manifiesto la formación del producto de reacción en la reacción enzimática.

15 El anclaje sólido (adsorción) que existe entre el sustrato y el soporte de acuerdo con el presente invento se realiza por el empleo de un soporte especial que - como se ha mencionados antes - es sólido e inerte para el sustrato enzimático y que tiene una superficie específica de al menos 50 m²/g, preferiblemente de al menos 200 m²/g. Debido a la unión sólida obtenida se elimina cualquier separación
20 indeseada del sustrato del soporte. Aunque no ha sido establecida completamente, la afinidad marcadamente en aumento que se produce entre el sustrato adsorbido sobre un soporte y la enzima correspondiente parece que debe atribuirse a la combinación con el soporte especial y principalmente
25 a su gran superficie específica. Aplicando el invento, se ha encontrado que aumentando la superficie específica del soporte aumenta la actividad o velocidad de la reacción entre el sustrato y la enzima. Así, se ha obtenido un aumento de actividad de hasta diez veces la normal.

30 Sin ninguna enumeración amplia de todos los sustra

1 tos conocidos que corresponden a diversas enzimas, se com-
prenderá que el invento es aplicable a cualquier sustrato
que satisfaga los requerimientos antes mencionados, es de-
5 cir el sustrato será difícilmente soluble o sustancialmen-
te insoluble en agua, lo que significa que el sustrato ten-
drá una solubilidad menor de 0,1% en peso en agua a 20°C,
y el sustrato será además estable y no experimentará hidró-
lisis o disolución en ausencia de la enzima correspondien-
te. Los sustratos preferidos en el contenido del presente
10 invento son los que se seleccionan del grupo de tricapro-
nato de glicerina (tricaproína), tripelargonina, tributirina
y adipato de bis-3,5,5-trimetil-hexilo, ésteres mixtos de
alcoholes polivalentes y ácidos orgánicos e inorgánicos.

15 El material soporte específicamente preferido en
el presente invento es sílice en forma de aerogel que tie-
ne una superficie específica de aproximadamente 200-300
m²/g. Dicho aerogel de sílice está disponible comercialmen-
te con la designación de "Aerosil", "Cab-O-Sil", "Kieselgel
G" de la firma Merck y "Fluosil" (Nynäs Petroleum AB, Sue-
20 cia).

Como se mencionó ya, la preparación de acuerdo
con el presente invento de la composición sustrato-soporte
se realiza preferiblemente aplicando el sustrato al sopor-
te por impregnación, estando el producto acabado en forma
25 de un polvo fácilmente manipulable, estable al almacenamien-
to, que es de fácil fluidez. De este modo, el soporte se
pone en suspensión, con agitación, en un líquido que con-
tiene sustrato o sustrato y diluyente de sustrato. Después
de este tratamiento se separa el líquido añadido. El resi-
30 duo se divide finamente de modo que se obtengan partículas

1 del tamaño y distribución de tamaño deseados.

5 En la realización más sencilla y más básica del invento se obtiene un material soporte con una capa de un sustrato del tipo definido en lo anterior. Como se ha mencionado ya, el soporte será sólido y químicamente inerte para el sustrato y tendrá una superficie específica por unidad de peso de al menos $50 \text{ m}^2/\text{g}$.

10 En otra realización del invento la capa aplicada al material soporte no consiste solamente en sustrato sino en sustrato en combinación con un diluyente. En la capa situada sobre el material soporte estará así presente el sustrato disuelto en el diluyente. Al contrario de la realización antes descrita, cuando el sustrato completo es directamente accesible a la acción de la enzima, solo el material
15 sustrato sustancialmente presente en la parte más exterior de la capa es directamente accesible a la acción de la enzima en esta última realización. Las propiedades del diluyente, tales como su capacidad de disolver sustratos, sus efectos de activar o inhibir enzimas, su viscosidad y tendencia a separarse bajo la acción de temperaturas bajas,
20 incluyen sobre la accesibilidad del sustrato a la acción de la enzima. Diluyentes adecuados son los aceites minerales, alcoholes alifáticos superiores, tales como decanol, dodecanol, alcohol estearílico y poliglicoles y otros compuestos hidrocarbonados inferiores volátiles que son miscibles
25 con el sustrato.

30 La accesibilidad del sustrato a la acción de la enzima puede estar influenciada además por mezcla del diluyente con agentes modificadores de la viscosidad, tal como estearato de aluminio.

1 La presente composición sustrato-soporte es útil
para cualquier fin adecuado para la reacción bajo la in-
fluencia de la enzima correspondiente. Es extremadamente
5 ventajoso emplear la composición sustrato-soporte en la nor-
malización y caracterización de enzimas. Un campo especial
de técnicas en el que el presente invento ha demostrado ser
particularmente útil, es el de los indicadores para una in-
dicación sensible de tiempo temperatura, por ejemplo respec-
10 to a las sustancias alimenticias que incluyen también las
sustancias alimenticias enfriadas y congeladas. Dichos in-
dicadores son conocidos sobre todo desde la memoria de la
patente de EE.UU. 2.671.028.

15 De este modo, si un indicador que comprende una
enzima y su sustrato así como una sustancia indicadora pa-
ra poner de manifiesto la formación del producto de reac-
ción en la reacción enzimática, se somete a las mismas con-
diciones de almacenamiento que una sustancia alimenticia,
es posible por calibración adecuada del indicador decidir
20 del cambio de color del indicador el estado de almacenamien-
to de la sustancia alimenticia.

25 Un indicador enzimático correspondiente que em-
plea el sustrato adsorbido en el soporte preparado por el
método de este invento, comprende como componentes activos
dicho sustrato combinado con una enzima adaptada al sustra-
to, y una sustancia indicadora, por ejemplo un indicador
de pH, para poner de manifiesto la formación de los produc-
tos de reacción en la reacción enzimática.

30 Con el empleo del sustrato adsorbido en el sopor-
te preparado de acuerdo con el invento y la enzima corres-
pondiente en suspensiones acuosas, pueden añadirse a la sus

1 pensión espesadores, tales como compuestos solubles en agua
de elevado peso molecular, por ejemplo agar o carboxicelu-
losa. Esto dará una ventaja debido a que el espesador, por
ejemplo agar, proporciona un cierto cambio de la velocidad
5 de reacción.

Para una ilustración adicional, el invento se des-
cribirá más completamente a continuación con referencia a
los ejemplos. Sin embargo debe observarse, que estos ejem-
plos son solamente ilustrativos y no restrictivos. Además
10 debe observarse que además de los sistemas enzimáticos pue-
tos de ejemplo, pueden ser útiles naturalmente otros siste-
mas enzimáticos y estar comprendidos dentro del espíritu y
alcance del presente invento.

Ejemplo 1

15 Preparación de un soporte revestido de sustrato.
100 g de sílice de grano fino ("Fluosil"® de
Nynäs Petroleum, Suecia) se introdujeron en pequeñas por-
ciones y con agitación en 2500 ml de cloruro de metileno
hasta que se obtuvo una suspensión homogénea.

20 La suspensión se mezcló a continuación con 100 g
de tricaprionato de glicerina (tricaproína, TC) y se conti-
nuó la agitación durante una hora más a temperatura ambien-
te.

25 A continuación se separó el cloruro de metileno
inyectando aire a través de boquillas de filtro y calentan-
do ligeramente a 30°C. Cuando el volumen de la mezcla se
había reducido a 1500 ml se interrumpió el calentamiento
para evitar la ebullición violenta, y se efectuó la expul-
sión continua del cloruro de metileno inyectando aire sola-
30 mente con agitación continua.

1 La expulsión final del cloruro de metileno se lle
vó a cabo en una vitrina de calentamiento a 50°C. Después
de acabar de secar en la vitrina de calentamiento se obtu-
vo una masa blanca quebradiza, que se trituró en un mortero
5 y se tamizó por un tamiz de anchura de malla deseada con
lo que se obtuvo un polvo de grano fino. Se obtuvo el resul-
tado correspondiente cuando la masa blanca quebradiza seca
se puso en suspensión en agua y se trituró en un molino co-
loidal.

10 Ejemplo 2

Preparación de un soporte revestido con sustrato
y diluyente.

Sílice de grano fino se puso en suspensión en clo-
ruro de metileno del mismo modo que en el Ejemplo 1. Una
15 mezcla de 50 g de tricaproina y 50 g de aceite para husos
se añadió a la suspensión con agitación, y se continuó la
agitación durante 1 hora a temperatura ambiente.

De forma correspondiente a la del Ejemplo 1 se se-
paró a continuación el disolvente y la masa resultante se
20 trituró en un mortero y un molino coloidal, respectivamen-
te. Se obtuvo un polvo de grano fino de soporte revestido
con sustrato y diluyente.

Ejemplo 3

Se repitió el Ejemplo 2 con la diferencia sin em-
25 bargo, de que el estearato de aluminio se añadió en una can-
tidad del 10% al aceite para husos. Se obtuvo un resultado
correspondiente al del Ejemplo 2.

Ejemplo 4

Se repitió el Ejemplo 2 pero se sustituyó el acei-
30 te para husos por alcohol estearílico. Esto requirió calen

1 tamiento con el fin de que la mezcla de tricaproína y alcohol estearílico fuera homogénea. Por otra parte se empleó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 2 y se obtuvo el resultado correspondiente.

5 Ejemplo 5

Se hicieron ensayos con soportes recubiertos de sustrato preparados de acuerdo con los Ejemplos 1-3. En estos ensayos se determinaron las propiedades indicadoras de respuesta tiempo-temperatura correspondientes por indicación en combinación con la enzima lipasa del páncreas. Se indicó la formación de ácido en la reacción enzimática por medio de un indicador de pH. La relación en peso del soporte a la capa que contiene sustrato en dicho soporte en todos los casos fue de 1:1. Los resultados se muestran en la Tabla 1. En la tabla se emplean las abreviaturas siguientes: Flousil = F; tricaproína = TC; aceite para husos = S; estearato de aluminio = Alst.

20 Tabla I

Temp. (°C)	<u>Tiempo relativo de cambio</u>		
	TC/F	TC/S/F	TC/S/10%Alst/F
+20	1,0	1,0	1,0
+ 4	2,4	2,0	1,7
- 5	15,5	20,0	33
-10	40,0	108	417
-15	321	856	970
-20	1396	-	-

1 Los resultados de los ensayos confirman lo que se
 ha establecido antes o sea, que partiendo de una cierta de-
 pendencia tiempo-temperatura de un soporte revestido sola-
 mente con sustrato, esta dependencia aumentará cuando el
 5 sustrato se combine con un diluyente, es decir se amplia-
 rán los tiempos relativos de cambio. La dependencia aumen-
 ta además si se añaden a la combinación de sustrato y dilu-
 yente, agentes que aumentan la viscosidad, tales como este-
 rato de aluminio.

10 Ejemplo 6

Para estudiar la acción de los espesadores en la
 suspensión acuosa del sustrato enzimático se añadió 0,25%
 de agar a las suspensiones acuosas de la enzima (lipasa del
 pancreas) y soporte revestido de sustrato de acuerdo con el
 15 Ejemplo 1. Se observaron los tiempos indicadores obtenidos
 y se muestran como tiempos relativos de cambio en la Ta-
 bla 2.

Tabla 2

20

Tiempo relativo de cambio

Temp. (°C)	TC/F 0,25% agar	TC/F
+20	1,0	1,0
25 + 4	2,4	2,4
- 5	12,7	15,5
-10	84,2	40,0
-15	1336	321
-20	>16000	1396

30

1 En el ensayo podrá observarse claramente el efecto del agar a temperaturas por debajo de -10°C .

Ejemplo 7

5 Se hicieron ensayos con el fin de comparar la actividad en la acción de la enzima (lipasa del pancreas) sobre el sustrato (tricaprina), por un lado sin un soporte y por otro lado, aplicado como revestimiento sobre un soporte de acuerdo con el Ejemplo 1. En el ensayo, se emplearon concentraciones variables de enzima y como medida de actividad se indicó el producto de reacción formado a 20°C por medio de un indicador de pH. Los resultados aparecen en la Tabla 3.

Tabla 3

Tiempo de cambio en minutos

Concentración de lipasa ($\mu\text{g/ml}$)	TC	TC/F
3	7,5	41
1	15	1,3
0,3	37	4,5
0,1	140	11,5
0,03	380	32

25 Se sacará como consecuencia de la Tabla 3 que la combinación del sustrato y el soporte de gran superficie específica implica un aumento de aproximadamente diez veces en actividad comparada con la actividad del sustrato solo.

1 Ejemplo 8

Lo mismo que en el Ejemplo 7 los ensayos se realizaron para comparar la actividad en la acción de la enzima sobre el sustrato, por un lado sin ningún soporte y por otro lado, aplicado como revestimiento sobre un soporte. Como enzima se empleó la lipasa del páncreas, el sustrato fue tripelargonina (TP), y el soporte fue "Fluosil" V 300 que tenía una superficie específica de aproximadamente $300 \cdot \text{m}^2/\text{g}$. Como medida de la actividad se indicó la formación del producto de reacción a 20°C. Los resultados se indican en la Tabla 4.

Tabla 4

15	<u>Concentración relativa de la enzima</u>	<u>Tiempo de cambio en horas (h)</u>	
		TP	TP/F
	32	21	4,25
	16	28	12
	8	77	25
20	4	240	46
	2	524	100
	1	-	240

25 Ejemplo 9

Se repitió el Ejemplo 8 con la diferencia, sin embargo, de que se empleó como sustrato tripropionina (TPP) en lugar de tripelargonina. La enzima era la lipasa del páncreas y el soporte "Fluosil". Los resultados se indican en la Tabla 5.

30

1

Tabla 5

	<u>Concentración relativa de la enzima</u>	<u>Tiempo de cambio en horas (h)</u>	
		TPP	TPP/F
5	32	1,25	0,5
	16	4,75	1,25
	8	21	2,5
	4	28	<21
	2	70	21
10	1	142	25

Ejemplo 10

Se repitió el Ejemplo 8 con la diferencia, sin embargo, de que se empleó como sustrato adipato de bis-
 15 -3,5,5-trimetil-hexilo (THA) en lugar de tripelargonina. Como antes, la enzima era la lipasa del páncreas y el soporte "Fluosil". Los resultados se indican en la Tabla 6.

20

Tabla 6

	<u>Concentración relativa de la enzima</u>	<u>Tiempo de cambio en horas (h)</u>	
		THA	THA/F
	16	70	21
	8	384	35
25	11	-	71
	2	-	192
	1	-	240-284

30 Parece evidente de los Ejemplo 8-10 que la combinación del sustrato y el soporte de gran superficie especi-

1 fica implica un fuerte aumento de la actividad comparada con la actividad al emplear un sustrato sin ningún soporte.

Ejemplo 11

5 Se aplicó sustancialmente el mismo procedimiento que el del Ejemplo 7 con la diferencia, sin embargo, de que se sustituyó "Fluosil" como soporte por "Kieselgel G" de la firma Merck. Este soporte tenía la composición siguiente: 13% de CaSO_4 , 0,02% de cloruro, 0,03% de Fe y el resto SiO_2 .

10 Los granos del soporte tenían un diámetro de 5-25 μm . Para el sustrato no adsorbido sobre un soporte se empleó una solución al 1% de tricaproína en acetona, mientras que para el sustrato adsorbido sobre un soporte se empleó una suspensión que contenía una cantidad correspondiente de Kieselgel

15 revestida con 30% de tricaproína. Después de la mezcla de la enzima (lipasa del páncreas) se determinó un pH de 5,4 a 20°C después de 28 minutos para el sustrato adsorbido sobre un soporte y después de 220 minutos para el sustrato no adsorbido sobre un soporte.

20 De este modo se comprenderá que eligiendo combinaciones adecuadas de sustrato, sustrato-diluyente, sustrato-diluyente-agente modificador de la viscosidad, puede proporcionarse indicación de respuesta tiempo-temperatura, adaptándose dichos indicadores a las condiciones aplicables

25 al almacenamiento de cierto artículo. También se comprenderá que por razón de la configuración muy manejable del sustrato de acuerdo con el invento, el indicador puede adaptarse además mezclando materiales sustrato de diferentes clases, es decir mezclando un material que esté revestido solamente con sustrato y un material que esté revestido con

30

1 una combinación de sustrato-diluyente-agente modificador
de la viscosidad, etc. Existen caminos inesperados abiertos
para una adaptación o control de la dependencia tiempo-tem-
peratura del indicador, y empleándose el sustrato de acuer-
5 do con el invento pueden proporcionarse indicadores que se
adaptan a cada fin concebible, como para la indicación de
material fotográfico, medicinas, sustancias alimenticias u
otros artículos sensibles que para mantener sus cualidades
requieren ciertas condiciones definidas de almacenamiento.

10 Debe observarse que la memoria descriptiva ante-
rior es meramente informativa pero no restrictiva. Eviden-
temente, puede recurrirse a muchas modificaciones y varia-
ciones dentro del espíritu y alcance del invento tal como
se define en las reivindicaciones que se acompañan.

15 REIVINDICACIONES

20 Los puntos de invención propia y nueva, que se
25 presentan para que sean objeto de esta solicitud de Paten-
te de Invención en España, por VEINTE años, son los que se
recogen en las reivindicaciones siguientes:

30 1ª.- Un método de preparar una composición de un
sustrato enzimático y un soporte, caracterizado porque un
sustrato enzimático que es difícilmente soluble en agua y

1 sustancialmente estable en ausencia de la enzima correspon-
diente y un soporte que es inerte para el sustrato enzimá-
tico y tiene una superficie específica de al menos 50 m²/g
se suministran con agitación a un disolvente orgánico para
5 la formación de una suspensión, después de lo cual se se-
para el disolvente orgánico y el residuo restante se tritu-
ra en partículas de tamaño deseado.

2a.- Un método según la reivindicación 1a, carac-
terizado porque se aplica también a la suspensión un dilu-
10 yente miscible con el sustrato.

3a.- Un método según la reivindicación 2a, carac-
terizado porque el diluyente se selecciona del grupo de
aceites minerales, alcoholes alifáticos superiores y poli-
glicoles.

15 4a.- Un método según la reivindicación 3a, carac-
terizado porque el aceite mineral es aceite para husos.

5a.- Un método según una cualquiera de las reivin-
dicaciones precedentes, caracterizado porque se suministra
también a la suspensión un agente modificador de la visco-
20 sidad.

6a.- Un método según la reivindicación 5a, carac-
terizado porque el agente modificador de la viscosidad es
estearato de aluminio.

7a.- Un método según una cualquiera de las reivin-
25 dicaciones precedentes, caracterizado porque el soporte tie-
ne una superficie específica de al menos 200 m²/g.

8a.- Un método según una cualquiera de las reivin-
dicaciones precedentes, caracterizado porque el soporte se
selecciona del grupo de polímeros orgánicos/inorgánicos,
30 óxidos inorgánicos, ácidos y sales.

1 9ª.- Un método según la reivindicación 8ª, caracterizado porque el soporte se selecciona del grupo de alúmina, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, aerogel de sílice y fosfato de calcio.

5 10ª.- Un método según la reivindicación 9ª, caracterizado porque el soporte es aerogel de sílice.

 11ª.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque se selecciona como sustrato el tricaprionato de glicerina.

10 12ª.- Un método de preparar una composición de un sustrato enzimático y un soporte.

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

15 Esta Memoria consta de veinte hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

13 ABR. 1976

P.A.

Alberto de Bizarra

Por Poder



20

25

30
JAR.