

PATENTE DE INVENCION
=====

Ref: R/ 2171.

Memoria Descriptiva

sobre:

Procedimiento para preparar soportes minerales injertados.

=====

Solicitante: RHONE-POULENC-INDUSTRIES, entidad francesa, residente en 22, avenue Montaigne, 75 Paris (8ème), Francia.

=====

La presente invención tiene por objeto un procedimiento para preparar soportes minerales injertados, útiles para la fijación de enzimas.

Los soportes minerales son productos conocidos pero, para ciertas aplicaciones, como por ejemplo la



5 fijación de enzimas, es necesario modificar la naturaleza química del soporte mineral injertándole un agrupamiento que mejore la fijación entre el soporte y la enzima. De este modo, se ha propuesto injertar silanos sobre los soportes minerales, que permiten la realización de un cierto número de reacciones de fijación directas, entre los citados soportes y ciertas enzimas.

10 En otros casos de acoplamiento entre soporte injertado y enzima, es frecuentemente necesario, si se desea una fijación estable en el tiempo, utilizar compuestos intermedios tales como la dicitolohexilcarbodiimida, el tiofosgeno o el glutaraldehído.

15 Por otra parte, soportes polímeros yodados se han propuesto igualmente, pero presentan el inconveniente de ser sensibles a los disolventes, temperaturas y presiones, lo que limita su empleo y, además, la posesión de una gran cantidad de grupos yodados, lo cual entrañan el riesgo de incluir la actividad de la enzima anteriormente fijada.

20 Los soportes de la invención utilizables en numerosos campos son insensibles a los disolventes, temperaturas, presiones y permiten, en el caso de fijación de enzimas, no solamente realizar nuevas reacciones, evitar la utilización de compuestos intermedios así como la presencia de un número demasiado grande de puntos activos, sino también obtener de forma simple, con excelentes rendimientos, fijaciones de enzimas estables y resistentes a los factores de desnaturalización.

25 Los soportes injertados, según la invención, están constituidos de óxidos, hidróxidos u otros compuestos minerales insolubles, porosos y caracterizados porque portan grupos halogenoalquilsilano sustituidos o no, cuyo resto alquilo com-

30



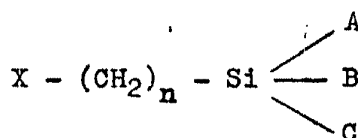
prende de 3 a 11 átomos de carbono:

Estos soportes injertados se obtienen haciendo reaccionar un soporte mineral que posea grupos hidroxilo con un halogenoalquilsilano que posea de 1 a 3 grupos reactivos con los grupos hidroxilo del soporte.

El soporte mineral utilizado debe poseer grupos hidroxilo, presentar una granulometría comprendida entre 40 μ y 5 mm, una superficie específica del orden de 2 a 600 m²/g y preferentemente de 20 a 70 m²/g cuando se destina a la fijación de enzima, un diámetro de poro del orden de 50 a 10.000 Å y un volumen poroso de 0,5 a 1,8 ml/g.

Como soportes que responden a estas características, se pueden citar las alúminas, la arcilla, el vidrio, los silicatos minerales, los óxidos metálicos y mas particularmente las sílices.

El compuesto a injertar es un halogenoalquilsilano de fórmula general:



en la que

- X representa un átomo de halógeno: cloro, bromo o yodo;
- n es un número entero de un valor comprendido entre 3 y 11;
- A, B y C, iguales o diferentes entre sí, representan un átomo de Cl, un grupo metoxi, etoxi, metilo o etilo, con la condición de que al menos uno de los sustituyentes A, B o C sea capaz de reaccionar con un grupo OH del soporte mineral.

Entre los compuestos mas particularmente aptos para ser injertados, se pueden citar el trietoxi-bromopropilsilano,



el trimetoxi-yodopropilsilano, el trietoxi-yodopropilsilano, el trietoxi-clorobutilsilano, el tricloro-cloropropilsilano, el dimetilcloro-cloropropilsilano, el metildicloro-yodoundecilsilano.

5 La reacción de injertado puede efectuarse por cualquier procedimiento conocido en medio disolvente o acuoso, a presión atmosférica o bajo presión y generalmente en caliente.

10 Los soportes injertados, según la invención son utilizables como soportes de catalizadores industriales, en cromatografía, cromatografía de afinidad, y más particularmente para la fijación de enzimas.

 En este caso, numerosas enzimas pueden fijarse.

 Estan representadas principalmente por:

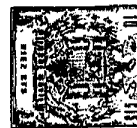
- oxidoreductasas tales como la glucosa oxidasa;
- 15 - hidrolasas tales como la lipasa, la pectinasa, la tripsina, la ureasa, la glucomilasa, la alfa-amino-acilasa.

20 La fijación de la enzima se efectúa según cualquier procedimiento conocido, bien en frío en solución acuosa tamponada según el pH compatible con la enzima, bien en caliente en disolventes hidrocarbonados o clorados, según el procedimiento de la solicitud de patente francesa 73.30413 depositada el 22 de agosto de 1973.

25 La elección de uno u otro de los procedimientos es función de la naturaleza de la enzima. Igualmente la elección del soporte y del injerto halogenado depende de la especificidad y de los caracteres propios de reacción de la enzima.

 Las enzimas así fijadas son particularmente estables y resistentes a los factores de desnaturalización, pH, temperatura.

30 Se dan a continuación, a título indicativo y no limi-



tativo, ejemplos de realización de la invención.

EJEMPLO 1

Se secan a 150°C bajo vacío durante 4 horas 100 g de una sílice en microesferas cuya granulometría es de 100 a 200 μ , la superficie específica de 44 m²/g, el diámetro de los poros de 660 Å y el volumen poroso de 0,9 ml/g.

La sílice secada se introduce en 200 ml de una solución en xilano de 20 g de trietoxi-bromopropilsilano y la mezcla se calienta 8 horas a 140°C. Tras refrigeración, la sílice injertada se escurre, se lava con acetona y se seca bajo vacío. El producto contiene 0,4 % en peso de bromo.

EJEMPLO 2

Se opera como en el ejemplo 1, pero con 20 g de trime toxiyodopropilsilano disueltos en 200 ml de xileno a ebullición.

El producto injertado contiene 0,45 % en peso de yodo.

EJEMPLO 3

Se secan bajo vacío a 150°C durante 4 horas 100 g de una sílice cuya granulometría está comprendida entre 200 y 400 μ , la superficie específica de 50 m²/g, el diámetro de los poros de 600 Å y el volumen poroso de 1,1 ml/g.

En un autoclave, se introduce la sílice secada y 250 ml de tolueno que contienen 10 g de trietoxi-clorobutilsilano y se calienta 2 horas a 190°C bajo presión autógena (5 bares).

Tras refrigeración, la sílice injertada se escurre, enjuaga con tolueno, a continuación, con acetona y finalmente se seca. El producto contiene 0,7 % en peso de cloro.

EJEMPLO 4

Se prepara un hidrogel agitando, en un matraz de 2 li-



5 tros, 230 ml de una solución acuosa de SO_4H_2 (a 120 g/l, los cuales se añade gota a gota una solución de silicato sódico (a 220 g/l en SiO_2). Cuando el pH es de 3,8, el sol obtenido se vierte así como 2 gotas de alquilsulfonato sódico en un matraz que contiene 8 litros de tricloroetileno y se agita la mezcla vigorosamente. En algunos minutos, hay formación de bolitas de hidrogel. Se añade entonces 1 litro de agua amoniacal pH 9, y a continuación se filtra.

10 Las bolitas se lavan 3 veces con HCl N/10 y a continuación con agua. El hidrogel obtenido contiene 80 % de agua y el tamaño de las bolitas es inferior a 200 μ .

15 En un matraz, se introducen 120 g de hidrogel obtenido, 15 g de trietoxi-yodopropilsilano y 200 ml de benceno. Se calienta a 80°C y por arrastre azeotrópico se recuperan 95 ml de agua.

Tras refrigeración, el producto injertado se escurre, se lava con acetona y se seca.

La superficie específica del producto obtenido es de 425 m^2/g , su volumen poroso de 1,1 ml/g.

20 El grado de yodo es de 2,1 % en peso.

EJEMPLO 5

Fijación de glucoamilasa en medio acuoso

25 Se efectúa la fijación sobre la sílice injertada en el ejemplo 1 (ensayo A) y sobre la sílice injertada en el ejemplo 2 (ensayo B).

1 g de soporte se añade a 20 ml de una solución tampón acetato 0,1 M, pH 4-5 que contienen 20 mg de glucoamilasa y la dispersión obtenida se agita 18 horas a 4°C.

30 Tras decantación, los soportes se lavan con 3 recogidas con agua destilada y la actividad se mide.



Los complejos soporte-enzima obtenidos se introducen en 10 ml de una solución de almidón al 3 % en peso en un tampón acetato 0,1 M, pH 4,5 y se dejan en contacto bajo agitación 10 mn a 40°C.

5

Tras separación, una valoración de los azúcares reductores liberados se efectúa en la fase líquida, por colorimetría con ácido 3,5-dinitrosalicílico. Varios lavados y medidas de actividad se efectúan de este modo sucesivamente. Entre cada medida los complejos se conservan en soluciones de NaCl 2 M.

10

Los resultados referidos a la glucosa y expresados en μ moles de glucosa liberada/mn/g de soporte son los siguientes:

		Ensayo A	Ensayo B	
15	actividad {	inicial	8,5	1,4
		tras 5 días	5	1
		tras 10 días	0	0,7

EJEMPLO 6

Fijación de glucoamilasa en medio orgánico

20

Se opera como en el ejemplo 5, con la diferencia de que 1 g de soporte se añade a 30 ml de una dispersión de cloroformo anhidro que contienen 50 mg de glucoamilasa. La mezcla agitada por sonicación se calienta al reflujo durante 2 horas. El disolvente se elimina entonces bajo vacío.

25

Los soportes se lavan con agua destilada y a continuación con NaCl y la actividad se mide. Se obtiene

		Ensayo A	Ensayo B	
30	Actividad {	inicial	15,6	1,2
		tras 5 días	11	0,7
		tras 10 días	4,5	0



Se comprueba que la sílice que porta un injertado fija mas enzima que la sílice con injerto yodado.

EJEMPLO 7

Fijación de glucosa oxidasa en medio acuoso

5 La enzima se fija tal como se ha dicho en el ejemplo 5.

La actividad enzimática se determina como sigue: se mezcla 1 g de complejo soporte-enzima, 20 ml de una solución con 18 g/l de glucosa en un tampón acetato, 0,1 M, pH 5,6, que
10 contienen 100 mg/l de O-dianisidina, y 40 μ l de una solución de peroxidasa con 2 mg/ml en un tampón acetato 0,1 M, pH 5,6.

Se sigue en función del tiempo la variación de absorbancia a 460 nm.

Los resultados expresados en μ molés de H₂O₂ liberadas/mn/g de soporte son los siguientes:

Ensayo A:	Actividad inicial	3,8
	Actividad después de 1 mes	1,76
Ensayo B:	Actividad inicial	4
	Actividad después de 1 mes	1,88

20 Se puede deducir que la fijación de la enzima en medio acuoso da resultados muy próximos, independientemente de que el soporte posea un injerto bromado o un injerto yodado.

EJEMPLO 8

Fijación de glucosa oxidasa en medio orgánico

25 La enzima se fija como en el ejemplo 6 y la actividad enzimática se determina como en el ejemplo 7. Se obtienen:

Ensayo A:	Actividad inicial	2,60
	Actividad después de 1 mes	0,80
Ensayo B:	Actividad inicial	5,20
	Actividad después de 1 mes	5,20

30



La fijación de la enzima sobre soporte injertado yodado es mejor que la obtenida sobre soporte con injerto bromado. Por otra parte el complejo soporte yodado-enzima es más estable en el tiempo.

5

EJEMPLO 9

Fijación de pectinasa en medio acuoso

Como en los ejemplos precedentes, la enzima se fija sobre la sílice injertada del ejemplo 1 (ensayo A) y sobre la sílice injertada del ejemplo 2 (ensayo B).

10

A 8 mg de pectinasa en solución en 20 ml de agua, se añaden 2 g de sílice injertada, a continuación se agita el conjunto a 4°C durante 24 horas.

15

Tras decantación, el complejo soporte-enzima se lava 3 veces con 20 ml de agua destilada, 3 veces con 20 ml de ClNa M y finalmente 3 veces con 20 ml de tampón acetato 0,1 M, pH 4.

La actividad enzimática se mide entonces:

20

2 g de los complejos soporte-enzima se dispersan en 10 ml de una solución de ácido poligalacturónico al 1 % en un tampón acetato 0,01 M, pH 4, a continuación la dispersión se calienta 10 minutos a 35°C.

25

En 5 ml del medio, el ácido poligalacturónico no transformado se defeca por adición de 0,3 ml de una solución acuosa de sulfato de zinc al 9 % y 0,3 ml de sosa 0,5 N. Tras centrifugación, el ácido D galacturónico, presente en la parte sobrenadante, se valora por el método del dinitrosalicilato.

30

Esta medida de actividad enzimática se repite tras 2,3 y 5 días. Entre cada valoración, los complejos soporte-enzima se lavan por puesta en contacto con 20 ml de NaCl 2 M du-



rante 15 horas, a continuación se enjuagan con agua destilada y con tampón acetato.

Se obtienen los resultados siguientes expresados en μ moles de ácido galacturónico hidrolizado/mn/g de soporte.

	Ensayo A	Ensayo B
Actividad	inicial	11,80
	tras 2 días	10,85
	tras 3 días	8,20
	tras 5 días	7,50

Se comprueba que el soporte con injerto bromado fija mejor enzima que el soporte con injerto yodado. Además el soporte con injerto bromado da un complejo mas estable en el tiempo.

La acción del complejo soporte con injerto bromado-pectinasa es entonces ensayada en continuo. En una columna de 20 cm de altura y 1 cm de diámetro, se colocan 6 g del complejo. La columna termostatada a 25°C se alimenta con una solución de ácido poligalacturónico al 0,4 % en un tampón acetato 0,01 M, pH 4 a razón de 52 ml/h.

La columna ha funcionado sin pérdida de actividad durante 10 días, dando un grado de hidrólisis del 42 %. Lo que muestra la buena estabilidad del complejo.

EJEMPLO 10

Fijación de pectinasa en medio orgánico sobre las sílices injertadas de los ejemplos 1 y 2

En 50 ml de benceno anhidro, se dispersan por sonicación 500 mg de pectinasa comercial, y a continuación 2 g de soporte injertado. Se calienta a continuación a ebullición y se mantiene 1 hora a esta temperatura.

El disolvente se evapora bajo presión reducida y el



complejo soporte-enzima obtenido se lava 3 veces con 20 ml de agua destilada, a continuación 3 veces con 20 ml de NaCl M y finalmente 3 veces con 20 ml de tampón acetato 0,1 M, pH 4.

La actividad enzimática se mide de la misma forma que en el ejemplo 9.

Se obtienen:

Ensayo A:	Actividad inicial	10,15
	Actividad tras 2 días	10,15
Ensayo B:	Actividad inicial	4,70
	Actividad tras 2 días	3,80

Como en el ejemplo 9, se comprueba que el soporte con injerto bromado fija mejor enzima que el soporte con injerto yodado.

EJEMPLO 11

Fijación de alfa-aminoacilasa en medio acuoso

Como en los ejemplos precedentes, se utilizan las sílices injertadas de los ejemplos 1 y 2.

10 ml de tampón fosfato 0,1 M, pH 7 que contienen 10 mg de enzima y 1 g de soporte se ponen en contacto bajo agitación a 4°C durante 48 horas.

Tras separación, el complejo soporte-enzima se lava 3 veces con 10 ml de agua destilada y 10 veces con 10 ml de NaCl M.

La actividad enzimática se mide. 1 g del complejo soporte-enzima y 10 ml de solución 0,1 M de acetyl DL-Metionina en tampón fosfato 0,1 M, pH 7 se calientan a 40°C durante 30 mn. La L-metionina liberada se valora por el método de la ninhidrina.

Los resultados obtenidos expresados en μ moles de L-metionina liberada, m/g de soporte son los siguientes:



Sílice con injerto bromado - Actividad: 100

Sílice con injerto yodado - Actividad: 30

EJEMPLO 12

Fijación de tripsina

5 Efectuada sobre las sílices injertadas de los ejemplos 1 (ensayo A) y 2 (ensayo B).

A 2 mg de tripsina dispersados por sonicación en 20 ml de hexano, se añaden 2 g de soporte, a continuación se lleva a ebullición y se mantiene 1 hora.

10 El hexano se evapora a continuación y los complejos soporte-enzima se lavan 3 veces con 20 ml de agua destilada, a continuación 3 veces con 20 ml de NaCl 1 M.

15 Se añade a los complejos obtenidos 1 ml de agua, a continuación 9 ml de solución de caseína al 0,3 % en peso en un tampón fosfato-citrato 0,025 M, pH 7. Las dispersiones se calientan entonces a 37°C durante 10 mn. Tras refrigeración y decantación, 4 ml de las soluciones se toman y 4 ml de una solución acuosa de ácido tricloroacético al 10 % en peso se añaden en cada solución, la caseína en exceso precipita, se filtra, a continuación el contenido en péptidos se valora sobre el filtrado, por el método de Lowry.

20 Los complejos soporte-enzima se lavan de nuevo con NaCl M y se efectúa una nueva medida de actividad enzimática tras 1 semana.

25 Los resultados expresados en μg de péptidos liberados/ml/mn/g de soporte son los siguientes:

Ensayo A: Actividad inicial	34,5
Actividad tras 1 semana	20,5
Ensayo B: Actividad inicial	4,5
Actividad tras 1 semana	4,5

30



Se comprueba que la sílice con injerto bromado fija mejor enzima que la sílice con injerto yodado, pero que, por el contrario, esta última da un complejo mas estable en el tiempo.

5

EJEMPLO 13

Fijación de ureasa

10

En 150 ml de cloroformo, se dispersa 1 g de ureasa y 6 g de la sílice injertada del ejemplo 2, a continuación se calienta la dispersión obtenida 1 hora al reflujo. El cloroformo se evapora entonces y el complejo soporte-enzima se lava 3 veces por 20 ml de tampón fosfato 0,1 M, pH 7, a continuación 3 veces por 20 ml de NaCl 2 M.

15

0,5 g del complejo obtenido se suspenden en 5 ml de tampón fosfato 0,025 M, pH 7 y se deja en contacto 2 mn. Se añaden entonces 2 ml de una solución acuosa de urea con 20 g/l y se deja en contacto 2 mn. La reacción se detiene por filtración. 5 ml de HCl N/10 se añaden al filtrado y el exceso de HCl se valora por NaOH 0,05 N.

20

Las operaciones de lavado y de medición de actividad se repiten varias veces. Los resultados expresados en μ moles de NH_3 producido en 2 mn estan resumidos en la tabla siguiente.

T A B L A

25

Condiciones de conservación		En seco en el refrigerador a 4°C	En suspensión en tampón fosfato en el refrigerador
Actividad	Inicial	200	200
	tras 4 días	266	278
	tras 11 días	218	283
	tras 19 días	168	268
	tras 27 días	187	228

30



Del exámen de esta tabla se puede deducir que la actividad es prácticamente constante en el tiempo, cualquiera que sean las condiciones de conservación.

EJEMPLO 14

Fijación de lipasa

La fijación se efectúa en medio acuoso sobre las sílices injertadas de los ejemplos 1 (ensayo A), 2 (ensayo B) y 3 (ensayo C).

En tubos de ensayo, se introducen 20 ml de una solución de lipasa al 1 % en agua destilada y 2 g de soporte. Los tubos se someten a continuación a una agitación lenta y regular durante 24 horas a 4°C.

Los complejos soporte-enzima obtenidos se separan de la solución de lipasa por decantación y se lavan 3 veces por 20 ml de agua destilada. Entonces se ponen en suspensión en 25 ml de una solución de sales biliares al 2 % en agua destilada durante 3 horas a 4°C, bajo agitación lenta, con el fin de desorber la enzima débilmente ligada al soporte. Los complejos se lavan a continuación con agua destilada.

La actividad enzimática se mide por el método de Desnuelle aplicado a una emulsión de aceite de oliva. Los ácidos grasos liberados se valoran por potenciometría a pH constante.

La actividad enzimática expresada en cantidad de ácidos grasos liberados en μ equivalentes/mn/g de soporte es de 8 para el ensayo A, 6 para el ensayo B y 14 para el ensayo C.

El complejo obtenido por fijación de la lipasa sobre la sílice con injerto clorado presenta pues la actividad mayor.

- N O T A -

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud de Patente, presentada en Francia con fecha 19 de abril de 1.974, bajo el número 74.13687, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR SOPORTES MINERALES INJERTADOS; caracterizándose por lo siguiente:

1º.- Procedimiento para preparar soportes minerales injertados, constituidos por óxidos, hidróxidos u otros compuestos minerales insolubles y porosos y en donde los injertos son grupos halogenoalquilsilano sustituidos o no, cuyo resto alquilo comprende de 3 a 11 átomos de carbono; caracterizado porque se hace reaccionar un soporte mineral que posea grupos hidroxilo con un halogenoalquilsilano que posea de 1 a 3 grupos reactivos con los grupos hidroxilo del soporte.

2º.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el soporte mineral posee grupos hidroxilo y presenta una granulometría de 40 μ a 5 mm, una superficie específica de 2 a 600 m²/g, un diámetro de poros de 50 a 10.000 Å y un volumen poroso de 0,1 a 1,8 ml/g.

3º.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque el soporte está representado por las alúminas, la arcilla, el vidrio, las sílices, los silicatos,

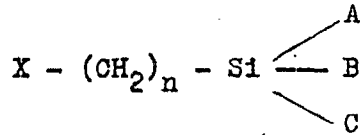
m/c



los óxidos metálicos.

4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el halogenoalquilsilano a injertar posee la fórmula general:

5



10

en la que X representa un átomo de cloro, de bromo o de yodo; n es un número entero comprendido entre 3 y 11; A, B y C iguales o diferentes entre si representan un átomo de cloro, un grupo metoxi, etoxi, metilo o etilo, con la condición de que al menos uno de los sustituyentes A, B o C sea reactivo con un grupo OH del soporte.

15

5ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 4, caracterizado porque el halogenoalquilsilano está representado por el trietoxi-bromopropilsilano, el trimetoxi-yodopropilsilano, el trietoxi-yodopropilsilano, el trietoxi-clorobutilsilano, el tricloro-cloropropilsilano, el dimetilcloro-cloropropilsilano, el metildicloro-yodoundecenilsilano.

20

6ª.- Procedimiento para preparar soportes minerales injertados, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 16 hojas, escritas a máquina por una sola cara.

25

Madrid

RHONE-POULENC-INDUSTRIES.

J. BOLAÑOS ASEES Y NODET
p. p. Firmado: L. García Fernández

M/E