



ESPAÑA

(19) ES	(11) NUMERO	(10) AI
(21)	440.240	
(22)	FECHA DE PRESENTACION	
	13-8-75	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO		
35556/74 17434/75	13-8-74 26-4-75	GRAN BRETAÑA GRAN BRETAÑA

(34) FECHA DE PUBLICIDAD	(35) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(36) PATENTE DE LA QUE SE DIVIDICIONA
	C08L; B01J	

(54) TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UN PREPARADO ENZIMATICO, UTIL PARA EFECTUAR TRANSFORMACIONES QUIMICAS.

(71) SOLICITANTE (S)

BEECHAM GROUP LIMITED.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Beecham House, Great West Road, BRENTFORD, Middlesex, Inglaterra.

(72) INVENTOR (ES)

RICHARD ANTHONY GODWIN SMITH, de nacionalidad británica.

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE

D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU.

1 Esta invención se refiere a un preparado enzimático y en particular a preparados para efectuar transformaciones químicas, que pueden ser recuperados del medio de reacción para ser utilizados de nuevo.

5 Las transformaciones catalizadas enzimáticamente constituyen operaciones importantes en un gran número de procesos químicos, por ejemplo: saponificación de lípidos utilizando una hidrolasa como la lipasa; degradación de proteínas utilizando un enzima proteolítico como la tripsina; 10 producción de esteroides utilizando una deshidrogenasa; producción de jarabes de glucosa a partir de almidón utilizando una hidrolasa; y producción de ácido 6-aminopenicilánico a partir de penicilinas como bencilpenicilina o ácido fenoximetilpenicilánico utilizando penicilin-acilasa.

15 En general, las reacciones enzimicas se llevan a cabo con el enzima en solución en el medio que contiene el substrato. (La expresión "substrato", cuando se utiliza en esta memoria, significa la sustancia que el enzima transforma para dar el producto). Debido a que el enzima se disuelve 20 en el medio de reacción, con frecuencia es muy difícil separarlo del substrato o del producto de la transformación cuando la reacción es completa. En general, cuando el producto se aísla de la mezcla de reacción, el proceso de separación produce la desactivación del enzima. Naturalmente, de esta forma el enzima resulta irrecuperable.

25 Con objeto de obviar esta dificultad de separación y proporcionar un sistema enzimático susceptible de ser reutilizado, se ha utilizado un método que consiste en unir el enzima a un soporte sólido insoluble, ya sea por adsorción 30 (véase, por ejemplo, la memoria de la patente británica

1 n° 1.264.147) o por enlaces covalentes ya sea directa o in-
directamente a través de grupos formadores de puentes (véa-
se, por ejemplo, las memorias de patentes británicas números
5 1.349.498, 1.387.460 y 1.365.886). Sin embargo, estos prepa-
rados insolubles presentan varios inconvenientes. En primer
lugar, al ser sólidos, están expuestos a deterioro mecánico
y eventualmente se rompen. En segundo lugar, la incorpora-
ción del enzima sobre la superficie del soporte sólido, y por
lo tanto la actividad específica del preparado, es con fre-
10 cuencia baja; en tercer lugar, frecuentemente el acceso del
substrato al centro activo del enzima se encuentra con impe-
dimentos estéricos. Los intentos de mejorar la actividad
específica de estos preparados insolubles de enzima/polímero
aumentando la superficie específica externa del sólido re-
15 quiere disminuir el tamaño de partícula del preparado sólido,
haciendo que la manipulación y en especial la separación por
filtración sean más difíciles, y el aumento de la superficie
específica interna haciendo las partículas más porosas pro-
duce partículas con menos resistencia mecánica.

20 Además, se han descrito ciertos compuestos de enzi-
ma-polímeros solubles en agua (véanse, por ejemplo, la memo-
ria de la patente británica n° 1.284.925 y las memorias de
las patentes británicas afines 53.822/72 y 44.542/73) donde
este enzima es combinado directa o indirectamente a través de
25 un grupo formador de puente sobre un soporte polimérico so-
luble en agua. Estos complejos de enzima/polímero son recu-
perables del medio de reacción acuoso por ultrafiltración.
Sin embargo, la ultrafiltración constituye una técnica difí-
cil y costosa, especialmente a gran escala y, por lo tanto,
30 es indeseable para aplicaciones industriales.

1 Ahora se ha descubierto que ciertos enzimas pueden ser ligados a grupos no polares para hacer que el preparado sea separable de los medios acuosos debido a su afinidad por los líquidos no miscibles con agua.

5 De acuerdo con esta invención, se proporciona un preparado enzimático que comprende un enzima unido a grupos suficientemente no polares, de manera que al poner en contacto el preparado en medios acuosos con un líquido inerte no miscible con agua, el preparado se asocia al líquido inerte no miscible con agua y puede separarse del medio acuoso.

10 El término "líquido inerte no miscible con agua", en el sentido utilizado aquí, significa un líquido que no reacciona con el preparado enzimático de manera que altere sustancialmente la actividad enzimica.

15 El término "asociado con" en el sentido utilizado antes incluye cualquier forma de interacción entre los grupos no polares del preparado enzimático y las moléculas de líquido no miscible con agua, que es suficientemente estable para proporcionar un medio de separación del preparado enzimático de un medio acuoso.

20 En general, cualquier enzima utilizado en un proceso de manufactura es adecuado para su incorporación a los preparados de este invento, siendo ejemplos de estos enzimas la amilasa, asparaginasa, proteasa neutra y alcalina, quimotripsina, celulosa, dextranasa, lipasa, oxinitrilasa, pepsina, penicilina-acilasa y tripsina.

25 Preferiblemente el enzima es lipasa, penicilinacilasa o tripsina.

30 Los grupos no polares adecuados que pueden ser unidos al enzima son los grupos hidrocarbilo que contienen como

1 mínimo 6 átomos de carbono, adecuadamente grupos alquilo
C₆ a C₃₀, por ejemplo n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo,
n-decilo, n-dodecilo, n-octadecilo, 4-metilpentilo, 4,4-dime-
5 tilpentilo, 3-etilhexilo; alquenilo C₆-C₅₀ como undeca-10-
enilo, oleilo, linoleilo; cicloalquilo C₆ a C₂₀; cicloalque-
nilo C₆ a C₂₀; grupos arilo y arilo sustituido, por ejemplo
fenilo opcionalmente sustituido por 1 a 3 grupos alquilo
C₁-C₆; y aralquilo, por ejemplo bencilo, 2-feniletilo, 4-fe-
nilbutilo y 2-toliletilo.

10 El enzima puede ser combinado directamente al grupo
no polar o indirectamente a través de un grupo formador de
puente.

15 Con algunos enzimas, la unión de un número de gru-
pos no polares directamente a una molécula de enzima produce
un cambio de la configuración y una variación de la activi-
dad del enzima. Debido a ello y, en algunas ocasiones, debido a
la estructura del enzima, algunas veces no es posible unir a
un enzima grupos no polares suficientes para que el preparado
20 sea separable del medio acuoso sin reducir inaceptablemente
la actividad del enzima.

25 Para vencer esta dificultad, con frecuencia es pre-
ferible producir un preparado enzimático en el que el enzima
está combinado o adsorbido sobre un soporte polimérico que
después puede llevar grupos no polares en lugar de los que
se encuentran sobre el propio enzima o además de ellos. Esto
también proporciona una forma conveniente de regular las pro-
porciones relativas de grupos no polares a enzima en el pre-
parado. También es posible, naturalmente, unir un enzima con-
teniendo grupos no polares suficientes para hacerlos separa-
30 bles de medios acuosos a un soporte polimérico que puede o no

1 llevar otros grupos no polares.

5 En un segundo aspecto, por lo tanto, la invención proporciona un preparado enzimático como el definido anteriormente, donde el enzima está unido a un soporte polimérico.

10 La unión del enzima a un polímero, en el sentido utilizado en esta memoria, comprende el enlace covalente y la adsorción sobre un soporte polimérico, siempre que la adsorción sea suficientemente intensa para retener el enzima sobre el soporte cuando el preparado se asocia al líquido no miscible con agua.

El soporte adecuado para uso en los preparados anteriores puede ser soluble o insoluble en agua.

15 Cuando se emplea un material polimérico insoluble en agua en los preparados de esta invención, es preferible que se encuentre finamente dividido con objeto de presentar una gran superficie para la unión del enzima y así comunicar una gran actividad específica al preparado.

20 Los materiales adecuados insolubles en agua son la celulosa en polvo y los derivados de celulosa como carboximetilcelulosa, resinas cambiadoras de ión, nylon, polisacáridos de elevado peso molecular como la agarosa y dextranos reticulados, polisacáridos modificados con agentes modificadores como epíclorhidrina o modificados de forma que incorporan grupos carboximétilo o aminoétilo, poliacrilatos y polimetacrilatos. Son especialmente preferidos la agarosa y las resinas de poliacrilato y polimetacrilato reticulado macroreticular.

25
30 Los materiales solubles en agua adecuados son los polímeros de origen natural, por ejemplo polisacáridos como

1 dextrano, dextrinas o almidón y los polímeros de origen natural que han sido modificados como almidón o celulosa parcialmente degradados; polisacáridos, oligosacáridos y sacáridos que han sido modificados con agentes modificadores como epíclorhidrina y celulosa modificada de forma que incorpo-
5 ra grupos carboximetilo o aminoetilo.

Entre los sacáridos y oligosacáridos modificados antes mencionados, se ha encontrado que son especialmente adecuados los copolímeros de epíclorhidrina y lactosa, dextrosa
10 o sacarosa. Un polímero preferido es el polímero de sacarosa-epíclorhidrina "Ficoll", con un peso molecular de 400.000 aproximadamente. El término "Ficoll" es una marca registrada.

15 Así como los polímeros de origen natural, también es posible utilizar polímeros sintéticos solubles en agua, tales como los polímeros de alcohol polivinílico y copolímeros de anhídrido maleico o acrílico con etileno, estireno, éter metilvinílico, éter divinílico o acetato de vinilo. Estos polímeros están descritos, por ejemplo, en la publicación
20 de patente de Alemania Occidental nº 1.948.177 y 1.948.298 y en las memorias de patentes británicas 1.290.701 y 1.223.281.

Una clase adecuada de copolímeros solubles en agua son los copolímeros de éter metilvinílico/anhídrido maleico
25 conocidos por "Gantrez AN", (El término "Gantrez AN" es una marca registrada).

El enzima puede ser unido directamente a un polímero que contenga un grupo no polar o, alternativamente, puede ser unido a los grupos que forman puentes con el soporte polimérico
30 al que puede ser unido el enzima. Adecuadamente, el gru-

1 po formador de puentes es una α,ω -diamina alifática C_2-C_{10} ,
como el 1,3-diaminopropano o el 1,6-diaminohexano. Una función
amino del grupo formador de puente va unida al polímero y la
5 otra queda libre para copularse con el enzima, por ejemplo a
través de un dialdehído soluble en agua con un glicoxal o glu-
taraldehído. El uso de estos grupos bifuncionales formadores
de puente también produce cierta reticulación entre las uni-
dades de enzima/polímero. Los grupos formadores de puente
10 pueden ser empleados entre enzima/soporte, enzima/grupo no
polar (con o sin presencia adicional de un soporte) o soporte/
grupo no polar.

El número de grupos no polares que se incorporan a
los preparados de esta invención depende de diversos facto-
res. La unión de grupos no polares al polímero y/o al enzima
15 establece un medio circundante hidrófobo en las proximidades
del enzima. Con algunos enzimas, un grado demasiado alto de
hidrofobia produce la desactivación del enzima debido a la
variación simultánea de configuración.

Se requiere un equilibrio entre la unión del número
20 mínimo de grupos no polares necesario para permitir la sepa-
ración de los medios acuosos y el número máximo compatible
con la estabilidad del enzima. La determinación de este equi-
librio debe forzosamente ser cuestión de rutina de prueba y
error. Los criterios por los que puede determinarse este
25 equilibrio son los siguientes:

- (1) El peso molecular del soporte polimérico.
- (2) El peso molecular del monómero unidad.
- (3) El porcentaje de unidades monoméricas en el polímero
30 sustituidas por grupos no polares.

1 (4) El tamaño de los grupos no polares.

(5) La identidad del enzima.

(6) El grado de sustitución del polímero por el enzima.

5 Por ejemplo, cuando el soporte es Gantrez AN 119
(peso molecular del polímero: 230.000, peso molecular del
monómero unidad: 156) donde 1 mol de Gantrez AN 119 está sus-
tituido con 1 mol de penicilin-acilasa, la sustitución mínima
necesaria para la separación efectiva de los medios acuosos
se produce cuando alrededor del 25 % de las unidades mono-
10 méricas están sustituidas con grupos n-decilo y la sustitu-
ción máxima para retener la actividad enzimática se produce
cuando alrededor del 50 % de las unidades monoméricas están
sustituidas con grupos n-octadecilo.

15 La invención también proporciona un procedimiento
para la producción de un preparado enzimático como el defini-
do anteriormente, cuyo procedimiento consiste en poner en
contacto un compuesto de fórmula (I):



20 donde R es un grupo no polar y X es un grupo funcional, o un
material polimérico que contiene por lo menos un grupo funcio-
nal, con un enzima unido a un grupo Y, donde y es un grupo
activo capaz de reaccionar con el grupo X.

25 El grupo X puede ser, por ejemplo, un grupo amino, car-
boxilo, aldehído, hidroxilo, tiol o azo; o grupos ligandos reac-
tivos derivados, por ejemplo, de dialdehídos como glicoxal o
gliceraldehído y/o diaminas, como 1,6-hexametilendiamina o
etilendiamina y/o ácidos carboxílicos, -aminoalifáticos co-
mo glicina o ácido 6-aminohexaminoico; o un material de so-
30 porte polimérico que contiene cualquiera de estos grupos fun-
cionales. Preferiblemente, X es un grupo amino o un radical
que contiene un grupo amino.

1 El grupo activo unido al enzima y capaz de reaccio-
nar con el grupo X puede ser un grupo presente sobre el enzi-
ma, ya sea inherentemente o por modificación como, por ejem-
plo, carboxilo, amino, tiol o grupos hidroxil fenólicos o li-
5 gandos anhídrido o un material de soporte polimérico conte-
niendo este grupo activo o un grupo ligando reactivo como los
ilustrados al tratar del grupo X.

10 La reacción entre el compuesto de fórmula (I) y el
enzima se lleva a cabo de la manera más ventajosa a un pH
prácticamente neutro, adecuadamente entre 4 y 9 y a una tem-
peratura comprendida entre -4°C y $+40^{\circ}\text{C}$, según el enzima de
que se trate. Preferiblemente, el pH es alrededor de 7,0 y
la temperatura es de 0 a 5°C .

15 Cuando el preparado enzimático está constituido esen-
cialmente por el enzima y grupos no polares solos, es prefe-
rible que el grupo X proceda de un dialdehído y/o una α, ω -
diamina, es decir, que los grupos no polares estén unidos al
enzima a través de tales grupos formadores de puentes.

20 Al formar el preparado enzimático de esta invención
que también comprende un soporte polimérico, es preferible
que el soporte sea primero modificado para incorporar el gru-
po no polar y, cuando sea necesario, el grupo formador de
puente, antes de la unión al enzima. En esta realización, el
grupo X en la fórmula (I) anterior representa un material po-
25 limérico combinado al grupo R no polar y a un grupo funcio-
nal.

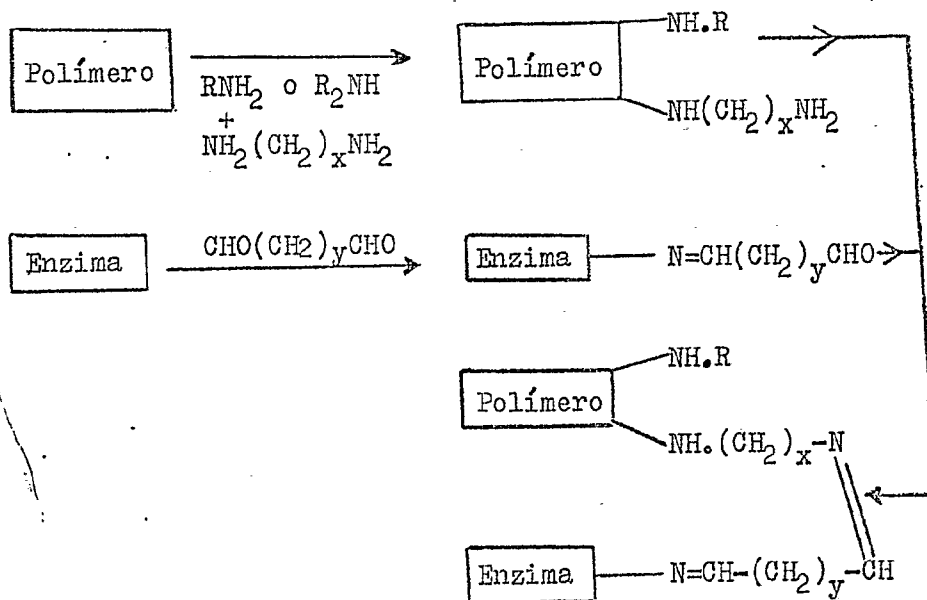
30 Los preparados de enzima/polímero modificado pueden
ser después obtenidos por cualquiera de los métodos conocidos
para ligar enzimas a polímeros. Estos métodos están descritos,
por ejemplo, en la patente británica nº 1.325.912 e incluyen

1 la copulación del enzima al polímero mediante el uso de reac-
tivos tales como haluros de cianógeno, especialmente bromuro
de cianógeno; s-triazinas, especialmente 2-amino-4,6-dicloro-
s-triazina; acil-azidas, compuestos de diazonio, por ejemplo
5 éter 2-hidroxi-3-(p-diazofenil)propílico; cianatos orgánicos
como el cianato de fenilo y carbodiimidias. Con frecuencia,
estos agentes ligantes se utilizan primero para reaccionar
con el polímero y proporcionar grupos reactivos sobre el mis-
mo, cuyos grupos se hacen después reaccionar con el enzima.
10 En algunos casos, los enzimas pueden reaccionar directamente
con el polímero, por ejemplo si este contiene grupos activos
como ligandos anhídrido o grupos azida de ácido o ha sido mo-
dificado de manera que contenga dichos grupos.

15 Por lo tanto, se observará que el método de reacción
y las condiciones empleadas para producir los polímeros mo-
dificados y ligarlos a los enzimas variarán de acuerdo con la
naturaleza del enzima y del material polimérico.

20 Para la mayoría de los preparados de enzima/polímero,
un procedimiento conveniente es el ilustrado en el esquema I.
La primera etapa consiste en unir al polímero (a) los grupos
no polares, preferiblemente a través de una amina primaria o
secundaria, $R.NH_2$ o $R_2.NH$ y (b) grupos formadores de puentes
como α,ω -diaminas, para su subsiguiente unión al enzima a
25 través de grupos dialdehído. Estas reacciones se llevan a
cabo adecuadamente en solución o suspensión acuosa, a pH al-
calino (adecuadamente pH 8-12) y a la temperatura ambiente.
Los grupos dialdehído sobre el enzima pueden ser después co-
pulados al polímero modificado en medios acuosos, a un pH
30 prácticamente neutro.

ESQUEMA I



donde

R es un grupo no polar como se ha descrito anteriormente;
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$ representa una α,ω -diamina y
 $\text{CHO}(\text{CH}_2)_y\text{CHO}$ representa un dialdehído.

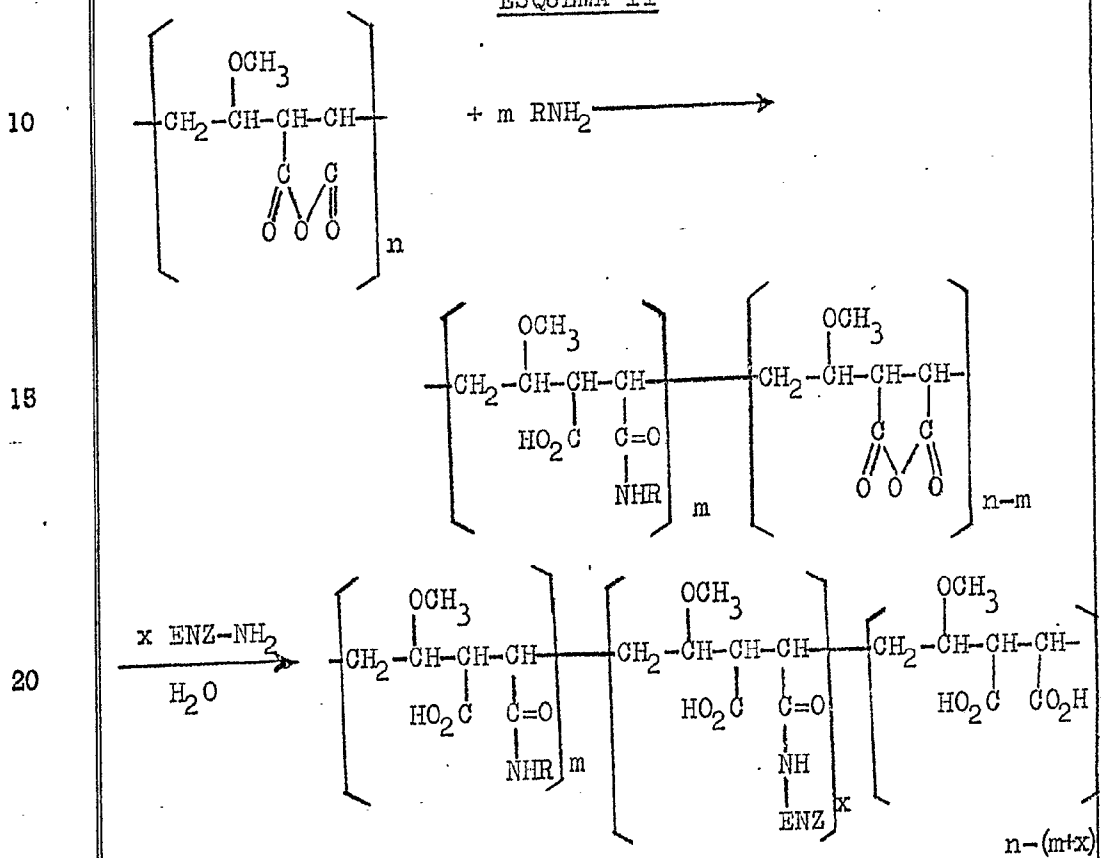
Con frecuencia es necesario activar los grupos sobre el polímero, preferiblemente con bromuro de cianógeno, antes de que sea posible la unión sobre los grupos no polares.

Por otra parte, algunos polímeros presentan grupos que pueden ser utilizados para copular con los grupos no polares y/o el enzima, si se desea sin grupos intermedios formadores de puente. Los preparados enzimáticos de la invención obtenidos de esta forma carecen entonces de la reticulación asociada con el uso de grupos formadores de puentes y con frecuencia poseen ventajosas propiedades como se indicará más adelante.

Por ejemplo, en los polímeros a base de anhídrido

1 maleico monómero, como los materiales "Gantrez", los grupos
anhídrido a lo largo del esqueleto pueden ser utilizados pa-
ra unirse a los grupos no polares y a los enzimas. Adecuada-
mente, el polímero es modificado primero por unión de grupos
5 no polares y después los grupos anhídrido residuales en el
polímero son utilizados directamente para copularse con el
enzima. Este procedimiento es ilustrado en el esquema II.

ESQUEMA II



25 R representa el grupo no polar antes citado; ENZ-NH₂ repre-
senta el enzima llevando un grupo amino.

Los polímeros Gantrez, por ejemplo Gantrez AN119
y Gantrez AN149 tienen además la ventaja de que se disuelven
sin reacción en ciertos disolventes apróticos no acuosos, co-
mo dimetilformamida, que también son buenos disolventes de
30

1 las aminas RNH_2 y R_2NH . Es posible una mezcla de reacción ho-
mogénea y, por lo tanto, estos disolventes constituyen medios
de reacción ventajosos para la unión de los grupos no polares
a estos polímeros cuando se producen los preparados enzimáti-
5 cos de esta invención.

Por consiguiente, en una realización preferida, los
preparados del enzima/polímero de esta invención se obtienen
haciendo reaccionar un material polimérico que contiene gru-
pos anhídrido sobre el esqueleto con una amina de fórmula
10 RNH_2 o R_2NH , en un disolvente aprótico polar no acuoso, donde
R es un grupo no polar y posteriormente uniendo el polímero
modificado a un enzima.

Es preferible que la amina se haga reaccionar con el
polímero en presencia de una base terciaria, por ejemplo piri-
15 dina. La expresión "base terciaria" utilizada aquí significa
una amina terciaria o una amina aromática heterocíclica.

Preferiblemente, el disolvente aprótico no acuoso
es la N,N-dimetilformamida o la propia base terciaria. La tem-
peratura a la cual se lleva a cabo la reacción depende de la
20 identidad del soporte polimérico y de la amina. Sin embargo,
en general, la reacción se lleva a cabo a una temperatura com-
prendida entre la ambiente y $100^{\circ}C$.

El soporte polimérico modificado puede ser aislado
del medio en el que se ha preparado por precipitación con un
25 disolvente menos polar, más adecuadamente éter dietílico o
por adición de la solución sobre el agua cuando se produce
hinchamiento e hidrólisis del anhídrido y aislamiento del
polímero modificado hidrolizado del medio acuoso utilizando
un líquido no miscible con agua o por centrifugación.

30 Después el enzima se une al soporte modificado aisla-

1 do antes mencionado, poniendo en contacto el soporte modifi-
cado con el enzima en una solución acuosa, opcionalmente con
un agente copulante, por ejemplo una carbodiimida sustituí-
da. Alternativamente, la mezcla de reacción no hidrolizada,
5 o el polímero modificado no hidrolizado disuelto en un pe-
queño volumen de un disolvente no acuoso polar, pueden ser
agregados directamente a una solución acuosa del enzima.

Alternativamente, la copulación puede ser realizada
adaptando primero el soporte no hidrolizado antes mencionado
10 por tratamiento del mismo con hidrato de hidrazina en solu-
ción en dimetilformamida. Este soporte adaptado, que después
se hidroliza y aísla del medio acuoso por centrifugación,
puede ser copulado con el enzima en medios acuosos utilizan-
do nitrito sódico como activador.

15 En otro aspecto, esta invención proporciona un pro-
cedimiento para efectuar una reacción enzimica, que consis-
te en poner en contacto en un medio acuoso un preparado en-
zimático como el aquí definido con un substrato para el en-
zima; después separar dicho preparado enzimático de la mez-
20 cla de reacción acuosa mediante puesta en contacto con un
líquido no miscible con agua, recuperar el producto de reac-
ción de la fase acuosa y opcionalmente reutilizar el prepa-
rado enzimático separado poniéndole en contacto con un nue-
vo substrato.

25 Para separar el preparado enzimático del medio acuo-
so puede utilizarse una amplia variedad de líquidos no mis-
cibles con agua. Los líquidos adecuados son alcanos, como
heptano, octano, nonano, decano y hexadecano; hidrocarburos
aromáticos, ésteres alifáticos superiores como trioleato de
30 glicerilo y alcoholes alifáticos C_4-C_{12} como n-decanol.

1 Al ponerse en contacto con este líquido, el prepara-
rado enzimático forma una capa superficial en el área de
contacto entre los dos. Con objeto de que este área de con-
tacto sea máximo, la operación de contacto habitualmente se
5 realiza con agitación, por ejemplo mediante un agitador ro-
tatorio o mediante sacudidas, para descomponer el líquido
no miscible con agua en pequeñas gotitas. Cada gotita es
circundada después por el preparado enzimático, adhiriéndose
a su superficie.

10 Este contacto del preparado enzimático con el líqui-
do no miscible con agua puede ser establecido antes, duran-
te o después de efectuar la reacción enzimica. Preferible-
mente, se establece antes de la reacción enzimica disper-
sando, por agitación, el preparado enzimático con un líqui-
15 do no miscible con agua, en un medio acuoso que contiene el
substrato. Así, durante la reacción enzimica, el preparado
está asociado a las gotitas de líquido no miscible con agua
que está presente en forma de emulsión en los medios acuosos
y la dispersión es mantenida durante la reacción por agita-
20 ción. Cuando se requiere separar el preparado enzimático,
se interrumpe la agitación y se reunen las fases respectivas.

Alternativamente, el preparado enzimático puede es-
tar presente en la mezcla de reacción acuosa en forma de so-
lución o suspensión y ponerse en contacto con el líquido no
25 miscible con agua después de la reacción, cuando hay que se-
parar el preparado enzimático.

La naturaleza de la asociación del preparado enzimá-
tico con el líquido no miscible con agua varía de acuerdo
con el material polimérico y/o los grupos no polares incor-
30 porados al preparado enzimático. Por ejemplo, con los prepa-

1 rados de enzima/polímero que contienen una reticulación im-
portante, se forman agregados sólidos y estas partículas se
adhieren a las gotitas de líquido no miscible con agua. Sin
5 embargo, con los preparados no reticulados, ilustrados por
los materiales con soporte de "Gantrez" antes descritos (y
por los preparados que no contienen polímero), normalmente
no se produce adherencia grosera de sólidos a las gotitas
y se forma sobre las mismas una monocapa de preparado enzi-
mático. Esto es especialmente ventajoso cuando la reacción
10 enzimica se lleva a cabo después de poner primero en contac-
to el preparado enzimático con el líquido no miscible con
agua para producir este sistema.

Qualquiera que sea la naturaleza de la asociación,
el contacto entre el preparado enzimático y el líquido no
15 miscible con agua (habitualmente en forma de gotitas) permi-
te la separación del preparado enzimático del medio acuoso.
Las gotitas, recubiertas con el preparado enzimático, tienen
aproximadamente la misma densidad que el líquido no miscible
con agua. Al dejar en reposo, las gotitas o flotan sobre la
20 superficie del medio acuoso (para los líquidos menos densos
que el agua) o se sedimentan en el fondo (para los líquidos
más densos). Así, se produce una capa separada que compren-
de el líquido no miscible con agua asociado con el preparado
enzimático, que es fácilmente recuperado del medio acuoso.

25 Para los líquidos que no flotan sobre los medios
acuosos o no se sedimentan de los mismos con suficiente ra-
pidez, pueden emplearse otros medios de separación, por
ejemplo centrifugación o paso de la mezcla a través de un
filtro repelente del agua, con lo que el medio acuoso pasa
30 y el líquido no miscible con agua (junto con el preparado

1

5

10

15

20

25

30

enzimático) queda detrás y es así separado. Un proceso enzimático preferido de esta invención es la preparación de ácido 6-aminopenicilánico a partir de una penicilina; utilizando un preparado a base del enzima penicilin-acilasa. En este caso, preferiblemente el enzima acilasa es obtenido de bacterias, por ejemplo cepas de Escherichia coli, cuando se utiliza para la escisión de la bencilpenicilina o de hongos del tipo actinomycetes cuando se utiliza para la escisión de la fenoximetilpenicilina. Estos enzimas son en general conocidos. Se utilizan en la producción de 6-APA dentro de un intervalo de pH de 6,0 a 9,0, preferiblemente de 7,0 a 8,5. Como la desacilación de una penicilina da lugar a la liberación de un ácido libre de la cadena lateral de penicilina, es necesario mantener el intervalo de pH antes mencionado durante el proceso de preparación de 6-APA por adición de un álcali cuando sea necesario, por ejemplo una solución de hidróxido sódico o amónico o trietilamina.

Una ventaja particular del uso de los preparados enzimáticos de esta invención es la fácil aplicación a un método continuo de reacción enzimática que puede ser llevada a cabo en el aparato mostrado en la Fig. 3 que acompaña a esta memoria, que es un esquema de un reactor adecuado.

Refiriéndonos a la Fig. 3, se utiliza un tanque reactor 1 con medios de agitación en forma de agitador 2, entradas 3, 4 y 5 para el substrato, el álcali y el enzima respectivamente y una salida 6. El tanque 1 también contiene una sonda 7 detectora del pH que controla una válvula 8 conectada a la entrada de álcali 4. La salida del tanque 6 alimenta, a través de una bomba 9, una vasija de separación 10 a través de una entrada 11. La vasija de separación dis-

1 pone de una salida superior 12 conectada a la entrada 5 al
tanque reactor, una salida inferior 13 para sacar el produc-
to de reacción a través de la bomba 14 y un filtro en forma
de vidrio sinterizado 15 colocado sobre la salida inferior
5 13. La entrada 3 del substrato es alimentada desde una bom-
ba 16 y las bombas 14 y 16 están conectadas para operar al
mismo caudal.

En funcionamiento, el tanque reactor 1 se carga a
través de la entrada 3 con el substrato en medio acuoso jun-
to con un preparado enzimático de la invención y un líquido
10 no miscible con agua. La mezcla es dispersada por el agitador
2 para producir una emulsión. El tanque 1 puede ser mantenido
a una temperatura constante, por ejemplo mediante una camisa
de agua (no mostrada) que circunda al tanque. Se agrega el
15 álcali a la emulsión contenida en el tanque a través de la
entrada 4 y la velocidad de esta adición viene gobernada por
la válvula 8 controlada por la sonda 7 de manera que el pH
de la mezcla de reacción se mantiene dentro del intervalo
requerido para una reacción óptima. Durante la reacción, es
20 accionada la bomba 9 y la mezcla es sacada por la salida 6
y transferida a la vasija de separación 10 a través de la en-
trada 11. En la vasija 10, el líquido no miscible con agua
(en este caso menos denso que el agua) forma una capa supe-
rior 17 separada que contiene el preparado enzimático. La
25 capa acuosa inferior 18, que contiene el producto de reac-
ción, es retirada a través del filtro 15 y desde allí a tra-
vés de la salida 13 mediante la bomba 14. La capa superior 17
que contiene el preparado enzimático asociado con el líquido
no miscible con agua se deja fluir a través de la salida 12
30 y volver al tanque reactor 1 a través de la entrada 5. A me-

1 dida que el producto es sacado por la salida 13, se añade
más solución de sustrato al tanque 1 a través de la entra-
da 3 mediante la bomba 16. Las bombas 14 y 16 están coordi-
nadas de manera que la velocidad de entrada de sustrato es
5 igual a la velocidad de salida de producto.

Los caudales, el tiempo de permanencia en el tan-
que reactor y otros parámetros de la reacción dependerán del
sistema particular de preparado enzimático/sustrato emplea-
do. De los resultados preliminares se deduce que un reactor
10 de 10.000 litros, utilizando 1000 kg de un preparado enzimá-
tico a base de penicilin-acilasa ligada a un soporte de
Gantrez AN149 puede procesar alrededor de 2000 kg de peni-
cilina G al día, a una concentración del 5 % en peso/volu-
men a 22°C y pH 7,8, aunque esta cifra puede ser mejorada
15 con preparados enzimáticos de mayor actividad específica.

Los siguientes ejemplos ilustran la producción y las
propiedades de algunos de los complejos poliméricos enzimá-
ticos de esta invención.

En los ejemplos, se emplean las siguientes abrevia-
20 turas para designar los polímeros y polímeros modificados,
enzimas, grupos ligantes, grupos no polares y agentes copu-
lantes:

Enzimas:

L : Lipasa

25 PA : Penicilin-acilasa

T : Tripsina

Soportes:

F : Ficoll

30 GAN : Gantrez

1

SR : Sepharose

T2000 : Dextrano T.2000

Grupo ligante enzima/soporte:

HD : 1,6-diaminohexano

5

Grupos no polares:

D : n-decilamino

DD : n-dodecilamino

OD : n-octadecilamino

Agentes ligantes y agentes activantes y grupos activados:

10

CMC : 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodi-
imidometano-p-toluensulfonato

G : Glutaraldehido

A : Hidrazida

15

El número entero que sigue a la notación representa el número del lote.

Por ejemplo, el preparado enzimático del Ejemplo 1 es designado por PAFHDDG. El enzima es por lo tanto la penicilin-acilasa (PA). El soporte es Ficoll (F) llevando grupos hexametilendiamino (HD) para unirse al enzima y también grupos decilo (D) como grupos no polares. La copulación entre el grupo amino libre del ligando hexametilendiamina y el enzima se realiza utilizando glutaraldehido (G).

20

También GAN 149 HDOD es el soporte modificado preparado a partir de Gantrez 149 modificado con 1,6-diaminohexano y octadecilamina y PAGAN 149 HDOD-G es el soporte modificado anterior al que se ha unido penicilin-acilasa en presencia de glutaraldehido.

25

30

EJEMPLO 1

(a) n-Decilamino, (6-aminohexilamino)-Ficoll (FHDD-1)

Se disuelven 5 g de Ficoll en 300 ml de agua y se ajusta a pH 11,0. Se añade 1 g de bromuro de cianógeno y el pH se mantiene durante la reacción empleando NaOH 2 N. La reacción cesa al cabo de 20 minutos a la temperatura ambiente y se añaden 4 g de n-decilamina y 0,5 g de 1,6-diaminohexano disueltos en 10 ml de metanol. El pH se ajusta a 9,5 con HCl 2 N y la mezcla se agita durante 16 horas a 4°C. La solución coloidal resultante se centrifuga a 22.000 g durante 1 hora para dar un gránulo blanco (35 g de peso húmedo) que se conserva y un líquido sobrenadante turbio que se desprecia.

(b) Penicilin-acilasa [n-decilamino, (6-aminohexilamino)-Ficoll] (PAFHDDG-1)

Se mezclan 21,6 g de peso húmedo de FHDD-1 con una solución reguladora 0,1 M de fosfato sódico a pH 6,0 (20 ml) y se ajusta a pH 6,2 con HCl 2 N. Una solución de penicilinacilasa de E. coli (50 ml, 340 mg de proteína parcialmente purificada) se ajusta a pH 6,2 a 0°C y se añaden 5 ml de una solución acuosa al 25 % en peso/volumen de glutaraldehído. Después de agitar a 0°C durante 30 minutos, se añade la suspensión de FHDD-1. La mezcla se agita a 0°C durante 3 horas y a 4°C durante 4 horas y después se congela (-20°C) durante 16 horas. Después de descongelar, la suspensión se centrifuga a 20.000 g y 4°C durante 45 minutos para dar gránulos gelatinosos pardos. El gel se suspende de nuevo en solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0 (30 ml) y se centrifuga otra vez a 20.000 g y 4°C durante 30 minutos. Se com-

1 binan los líquidos que sobrenadan y los gránulos pardos (apro-
ximadamente 6,3 g de peso húmedo) se suspenden en solución
reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0 y se mantienen
a 4°C. La suspensión de gránulos, cuando se mezcla con su
5 propio peso como mínimo de n-decanol, flota con el decanol
sobre la superficie de las soluciones acuosas dejando un lí-
quido infranadante de enzima en partículas. Las actividades
enzimáticas de los gránulos, del líquido que sobrenada y del
material enzimático se encuentran en la Tabla I. Se recupe-
10 ra aproximadamente el 43 % de la actividad enzimática ini-
cial, encontrándose prácticamente la totalidad en el conju-
gado. La actividad del complejo puede ser recuperada sustan-
cialmente de las soluciones de penicilina por flotación o
por centrifugación convencional.

15

TABLA I

Actividad de penicilin-acilasa del PAFHDDG-1

Procedimiento de ensayo: Se disuelve la sal sódica
de penicilina G a la concentración apropiada en 20 ml de una
solución reguladora de fosfato sódico 0,02 M a pH 7,8 y 37°C
20 y se añade la muestra de enzima. El pH se mantiene por adi-
ción de NaOH 0,1 N o 0,5 N y la actividad es expresada como
la velocidad inicial de producción de ácido 6-aminopenici-
lánico (6-APA). En el procedimiento de ensayo 1, se añaden
2 ml de n-decanol a la mezcla de reacción agitada y, después
25 de la determinación, se deja que la suspensión se separe en
dos capas. La capa superior se separa con una jeringa y se
vuelve a utilizar. En el procedimiento 2, la suspensión final
se centrifuga a 2000 g durante 15 minutos y los gránulos se
30 vuelven a utilizar.

30

1

<u>Material</u>	<u>Cantidad</u>	<u>% en peso/volumen de penicilina G en el ensayo</u>	<u>Velocidad inicial de producción de 6-APA, moles/minuto x 10⁻⁴</u>
Enzima	1 ml	5	0,885
5 PAFHDDG-1 sobrenadante	1 ml	5	0,008
PAFHDDG-1	0,5 g	5	1,500
PAFHDDG-1, re-ensayos			
Procedimiento 1. 1.	0,5 g	5	0,860
2.	0,5 g	5	0,550
10 3.	0,5 g	5	0,500
Procedimiento 2. 1.	0,5 g	5	1,300
2.	0,5 g	5	1,210
3.	0,5 g	5	1,110
15 4.	0,5 g	5	1,030

EJEMPLO 2

(a) n-Octadecilamino (6-aminohexilamino)-Ficoll (FODHD-1)

Se disuelven 5 g de Ficoll en 300 ml de agua y la solución se trata con 1 g de bromuro de cianógeno a pH 11,0 como antes. Al cabo de 20 minutos, la solución se ajusta a pH 10,0 con HCl 2 N y se añade una solución de 5 g de n-octadecilamina y 0,5 g de 1,6-diaminohexano en 20 ml de metanol. El pH se ajusta de nuevo a 10,0 con HCl 2 N y la mezcla se agita a 4°C durante 72 horas. El producto se centrifuga a 20.000 g y 4°C durante 45 minutos. Se forman unos gránulos blancos sueltos (25 ml, retenido) y un líquido sobrenadante transparente con espuma superficial (octadecilamina).

20

25

(b) Penicilin-acilasa [n-octadecilamino, (6-aminohexilamino)-Ficoll] (PAFODHDG-1)

30

Se ajustan 25 ml de penicilin-acilasa (170 mg de

1 proteína) a pH 6,2 a la temperatura ambiente y se añaden
2,5 ml de glutaraldehído al 25 % en peso/volumen. La mezcla
se agita a la temperatura ambiente durante 15 minutos, se
añaden 10 ml de FODHD-1 y la suspensión se ajusta a pH 6,2
5 con HCl 2 N. Después de agitar a 4°C durante 3 horas, el ma-
terial se centrifuga a 20.000 g y 4°C durante 30 minutos. Los
gránulos de color rosa se suspenden de nuevo en solución re-
guladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0 y se mantienen a
4°C. La suspensión es flotada eficientemente por n-decanol,
10 y su actividad se encuentra en la Tabla II. La recuperación
de actividad es aproximadamente del 60 %.

TABLA II.

Actividad de PAFODHDG-1

15 Procedimiento de ensayo: Como en la Tabla 1. Se utiliza siem-
pre penicilina G al 5 % en peso/volumen.

<u>Material</u>	<u>Cantidad</u>	<u>Velocidad inicial de producción de 6-APA, moles/minuto x 10⁻⁴</u>
Enzima	1 ml	0,885
PAFODHDG-1	0,5 g	0,940
20 Re-ensayos (Procedimien- to 2)		
1.	0,5 g	0,800
2.	0,5 g	0,585

EJEMPLO 3

25 (a) n-Decilamino, (6-aminohexilamino)-Dextran T2000
(T2000HDD-1)

30 Se disuelven 10 g de dextrano (peso molecular pro-
medio 2.000.000) en 800 ml de agua y se activa con 2,5 g de
bromuro de cianógeno como se ha descrito antes. Al cabo de
20 minutos se añaden 5 g de n-decilamina y 1,0 g de 1,6-

1 diaminohexano y se ajusta el pH a 10,0. La solución se agi-
ta a 4°C durante 16 horas y después se centrifuga a 20.000 g
y 4°C durante hora y media. Los gránulos formados se suspen-
den de nuevo en 100 ml de HCl 0,1 N y se centrifugan otra
5 vez (20.000 g/1 hora). Se conservan los segundos gránulos
(c = 50 g de peso húmedo).

(b) Penicilin-acilasa [(n-decilamino, (6-aminohexilamino)-
dextran T2000] PAT2000HDDG-1.

10 Se homogeneizan 10 g de peso húmedo de T2000HDD-1
en solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 6,0 y la
suspensión se ajusta a pH 6,2. Se ajustan 50 ml de penici-
lin-acilasa (340 mg de proteína) a pH 6,2 y se añaden 5 ml
de glutaraldehído al 25 % en peso/volumen. Esta solución se
15 agita durante 45 minutos a 4°C y después se añade el
T2000HDD. La mezcla se agita a 4°C durante 30 minutos y des-
pués se mantiene a -20°C durante 16 horas. Después de des-
congelar, la suspensión se agita a la temperatura ambiente
durante 1 hora y después se centrifuga a 6000 g a 22°C du-
rante 30 minutos. Se conserva el líquido que sobrenada y los
20 gránulos se suspenden de nuevo en 75 ml de solución de fos-
fato sódico 0,1 M a pH 7,0. Centrifugando como antes, segui-
do de re-suspensión y nueva centrifugación, se obtienen
8,0 g de peso húmedo de gránulos marrones. Estos son flota-
dos suficientemente por el n-decanol y menos eficientemente
25 por el n-heptano. La actividad de este preparado viene
dada en la Tabla III. Aproximadamente un 10 % de la activi-
dad enzimática original se encuentra en el conjugado.

TABLA III

Actividad de PAT2000HDDG-1

Procedimiento de ensayo: Como antes, utilizándose siempre penicilina G al 5 % en peso/volumen.

5

<u>Material</u>	<u>Cantidad</u>	<u>Velocidad inicial de producción de 6-APA, moles/minuto x 10⁻⁴</u>
Enzima	1 ml	0,875
PAT2000HDDG-1		
Sobrenadante	1 ml	0,022
10 PAT2000HDDG-1	0,5 g	0,270
Re-ensayo (Procedimien to 2)	0,5 g.	0,155

EJEMPLO 4

(a) n-Decilamino, (6-aminohexilamino) Sepharose 4B (SRHDD-1)

15

Se hinchan 2 g de peso seco de Sepharose 4B activado con bromuro de cianógeno en 50 ml de HCl 10⁻³N a 4°C durante 15 minutos y después se lava sobre un vidrio sinterizado con dos porciones de 100 ml de HCl 10⁻³N. Se añade el gel a una solución de 20 ml de bicarbonato sódico 0,1 M, 5 ml de etanol, 0,5 g de n-decilamina y 0,1 g de 1,6-diaminohexano. La mezcla se hace girar lentamente a 4°C durante 16 horas y después se filtra en un vidrio sinterizado. El gel se lava con succión empleando cuatro porciones de 20 ml de HCl 10⁻³N, cuatro porciones de 20 ml de etanol y cuatro porciones de 50 ml de agua y después se suspende de nuevo en agua y se mantiene a 4°C.

20

25

(b) Penicilin-acilasa [n-decilamino, (6-aminohexilamino)-
Sepharose 4B] PASRHDDG-1

Se suspenden 1,5 g del gel SRHDD-1 secado por succión en 5 ml de solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M

30

1 a pH 6,0 y se añaden 0,5 ml de glutaraldehído a 25 % en pe-
so/volumen. La mezcla se agita durante 2 horas a la tempe-
ratura ambiente y después se seca por succión sobre un vi-
5 drao sinterizado. A continuación se añade el gel a una mez-
cla de 2 ml (13,6 mg) de penicilin-acilasa y 3 ml de solu-
ción reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 6,0. Esta mez-
cla se agita durante 24 horas a 4°C, se seca por succión y
se lava sobre el vidrio sinterizado con cinco porciones de
10 20 ml de solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a
pH 7,0. Se suspende en 5 ml de la misma solución reguladora.
Las perlas resultantes son flotadas con n-decanol en con-
traste con el Sepharose no modificado que se sedimenta de
las suspensiones acuosas que contienen n-decanol. La activi-
dad de este preparado está indicada en la Tabla IV. Aproxí-
15 madamente el 72 % de la actividad original está presente en
el conjugado.

TABLA IV

Actividad de la penicilin-acilasa de PASRHDDG-1

20 Procedimiento de ensayo: Como antes, empleándose siempre pe-
nicilina G al 5 % en peso/volumen.

<u>Material</u>	<u>Cantidad</u>	<u>Velocidad inicial de producción de 6-APA, moles/minuto x 10⁻⁴</u>
Enzima	1 ml	0,885
PASRHDDG-1	2 ml	0,505
Re-ensayos		
Procedimiento 2. 1.	2 ml	0,410
2.	2 ml	0,375
Procedimiento 1. 3.	2 ml	0,270

EJEMPLO 5

[n-Decilaminoglutaral-penicilin-acilasa] (PADDG-1)

Se ajustan a pH 6,2 40 ml (272 mg) de penicilin-acilasa y se añaden 4 ml de glutaraldehído al 25 % en peso/volumen. Después de agitar durante 20 minutos a 0°C, se añaden 6 ml de n-decanol y 0,6 ml de n-decilamina y se continúa agitando fuertemente a 0°C durante 6 horas y a la temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se centrifuga a 2000 g y 22°C durante 10 minutos para dar una capa sobrenadante parda que se separa y se mantiene en suspensión en solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0 (30 ml). El material flota espontáneamente hasta la superficie de las suspensiones acuosas pero es algo menos dispersable que los conjugados poliméricos y tiene tendencia a formar agregados grandes. Un ml de la suspensión, analizado como en el Ejemplo 1, presenta una actividad de $0,49 \times 10^{-4}$ moles/minuto, lo que representa una retención del 42 % de la actividad de acilasa en el conjugado.

EJEMPLO 6

Tripsina-[n-octadecilamino, (6-aminohexilamino)-Ficoll]-
(TFODHDG-1)

Se disuelven 50 mg de tripsina exenta de sal en 20 ml de solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 6,0 y 0°C. Se añade 1 ml de glutaraldehído (25 % en peso/volumen) y la mezcla se agita durante 15 minutos a 0°C. Se añaden 10 ml de FODHD-1 del Ejemplo 2a y la solución se ajusta a pH 6,2 con HCl 2 N. La mezcla se agita durante 16 horas a 4°C y después se centrifuga a 20.000 g y 4°C durante 30 minutos. Los gránulos se suspenden de nuevo en 20 ml de agua y se filtran utilizando papel de separación

1 de fases Whatman IPS. El residuo se suspende de nuevo en
20 ml de HCl 10^{-3} M y se filtra otra vez. La resuspensión
(HCl 10^{-3} M) y la centrifugación (10.000 g/14°C/20 minutos)
se repiten dos veces y así se obtienen 2,65 g de un gel
5 pardo. Este material es flótable con n-decanol y n-heptano.
La actividad del conjugado está indicada en la Fig. 1. El
procedimiento de ensayo fue el siguiente:

Se disuelve N- α -benzoil-DL-arginin-p-nitroanilida
en 5 ml de dimetilformamida y se añade sobre 45 ml de solu-
10 ción reguladora Tris 0,05 M a pH 8,3 (conteniendo 10 milimo-
les de CaCl₂) para dar una solución 2×10^{-3} M del substrato
cromogénico. Se añaden 5 ml de n-heptano y la mezcla se agi-
ta fuertemente a 22°C. Se agrega la muestra de enzima y se
toman a intervalos partes alícuotas de 5 ml de la mezcla.
15 Dejando en reposo brevemente o centrifugando suavemente, se
separa la capa de heptano (arrastrando con ella al TFODHDG-1).
Se separa la capa acuosa inferior y se toma el espectro
D, 0¹_{400 nm} cm para determinar la liberación de p-nitroanilina.
Unas gotitas de heptano constituyen un "blanco" significati-
20 vo para el valor de la absorbancia. En algunos casos, la ca-
pa inferior se diluye para facilitar las lecturas de absor-
bancia. Después de la lectura, el heptano y las capas acuo-
sas se devuelven a la mezcla de reacción agitada. La activi-
dad total retenida por el conjugado es del 17 % de la acti-
25 vidad amidolítica original.

EJEMPLO 7

Lipasa-[n-decilamino, (6-aminohexilamino)-Dextran T2000]-
(LT2000HDDG-1)

30 Se disuelven 200 mg de lipasa de Candida Cylindracea
en 20 ml de solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a

1 pH 6,0 y se ajusta a pH 6,2. Se añaden 2 ml de glutaraldehi-
do al 23 % en peso/volumen y la mezcla se agita durante 30
minutos a la temperatura ambiente. De la suspensión precipi-
ta con etanol el T2000HDD-1 (Ejemplo 3) y el precipitado se
5 vuelve a hinchar en agua. Se homogeneizan 10 g del gel resul-
tante en 20 ml de solución reguladora de fosfato sódico
0,1 M a pH 6,0 y se agrega a la mezcla de enzima-glutaral-
dehído. El pH se ajusta a 6,2 y la mezcla se agita a 4°C
durante 16 horas. La suspensión se centrifuga a 20.000 g
10 y 4°C durante 30 minutos y los gránulos se suspenden de nue-
vo en 50 ml de solución de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0 y
se centrifugan otra vez. Este procedimiento se repite dos ve-
ces más. Los gránulos finales (8,4 g de peso húmedo) se sus-
penden de nuevo en 20 ml de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0.
15 La suspensión es flotable con n-decanol y n-heptano. La ac-
tividad del conjugado está indicada en la Fig. 2. El proce-
dimiento de ensayo fue el siguiente:

20 Se agitan rápidamente 5 ml de laurato de p-nitrofe-
nilo (10^{-2} M en n-heptano) con 20 ml de fosfato sódico 0,1 M
a pH 8,0 y a la temperatura ambiente. Bajo estas condicio-
nes, no es detectable la hidrólisis enzimica del éster du-
rante 1 hora o más. Después de la adición del enzima, se re-
tiran partes alícuotas de 5 ml a intervalos, se centrifugan
25 a 4000 g durante 1,5 minutos y se separa la capa inferior
(acuosa). El $D_{400}^{1\text{ cm}}$ se determina exactamente 3 minutos
después de separar la parte alícuota original. Después las
capas acuosa y heptánica se devuelven a la mezcla agitada.
30 (Como el substrato se encuentra en la fase no acuosa en este
experimento, la velocidad de agitación, es decir, el grado
de dispersión, debe mantenerse constante durante todo el

1 experimento).

Aproximadamente el 1 % de la actividad de lipasa original se incorpora al conjugado.

EJEMPLO 8

5 (a) GAN149HDOD-1

Se suspenden 1 g de n-octadecilamina y 0,2 g de 1,6-diaminohexano en 10 ml de metanol y se añade a 200 ml de solución reguladora de fosfato sódico 0,2 M a pH 8,0 conteniendo 40 ml de metanol. Se añaden poco a poco y agitando fuertemente 2 g de Gantrez 149. La mezcla se agita durante 16 horas a la temperatura ambiente y después se centrifuga a 12.000 g durante 1 hora a la temperatura ambiente. La nata formada y el líquido que sobrenada se desprecia y los gránulos se suspenden de nuevo en solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0 (100 ml) y se centrifugan otra vez como antes. Los gránulos gelatinosos (80 g) se mantienen a 4°C.

15 (b) PAGAN149HDOD-1-G

Se ajustan 20 ml de solución de penicilin-acilasa (1,36 x 10⁻⁷ unidades, 136 mg de proteína) a pH 6,2 y se añaden 2 ml de glutaraldehído al 25 % en peso/volumen en agua. La mezcla se agita a la temperatura ambiente y se añade una suspensión de 10 g de GAN149HDOD-1 en 12 ml de solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 6,0. El pH se mantiene a 6,2 y se continúa agitando a la temperatura ambiente durante 2 horas. La suspensión se centrifuga durante 1 hora a 20.000 g y 4°C y se conservan los gránulos (14 g). Los gránulos se suspenden de nuevo en 10 ml de solución de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0 y se repite la centrifugación. Los gránulos finales se mantienen a 4°C.

1 Actividad específica: 3×10^{-5} moles de 6-APA.min⁻¹ (5 % de penicilina G, pH 7,8, 22°C)

Recuperación de la actividad: 21 %. Flotable con n-decanol o n-decano.

5

EJEMPLO 9

(a) GAN149HDOD-2

10 Se disuelven 5 g de n-octadecilamina en 50 ml de etanol y se añaden a 1 litro de solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 9,0 conteniendo 200 ml de etanol. Se añaden poco a poco 5 g de Gantrez 149 a lo largo de tres cuartos de hora, con agitación. El pH se mantiene entre 8 y 9 con NaOH 2 N. Después de la adición del Gantrez, se añaden 5 g de 1,6-diaminohexano y la mezcla se agita a la temperatura ambiente durante 6 horas. El pH se reduce a 3,0 con HCl concentrado y la suspensión se centrifuga a 12.000 g durante 1 hora a la temperatura ambiente. El líquido que sobrenada se desprecia y los gránulos se suspenden de nuevo en 550 ml de agua y se vuelven a centrifugar para dar 150 g de gránulos blancos finales que se conservan a 4°C.

15

20

(b) PAGAN149HDOD-2-G

25 Se mezclan 100 ml de una solución de penicilinacilasa ($9,8 \times 10^6$ unidades, 88 mg de proteína) con 15 g de GAN149HDOD-2, 20 ml de solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 6,0 y 1 ml de azida sódica al 2 % en peso/volumen y se homogeneizan brevemente a 0°C. La mezcla se ajusta a pH 6,8 a 0°C durante 4,5 horas y después se centrifuga a 20.000 g y 4°C durante 1 hora. Los gránulos se suspenden de nuevo en fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0 y se centrifugan otra vez. Estas operaciones se repiten después hasta obtener unos gránulos finales que pesan 11,2 g y se conservan a

30

30

1 4°C.

Actividad específica: $1,8 \times 10^{-5}$ moles de 6-APA.min⁻¹.g⁻¹

(Condiciones como en el caso anterior)

5 Recuperación de actividad: 55 %. Flotable con n-decanol o
n-decano.

EJEMPLO 10

Tripsina (n-decilamino-Gantrez AN 119)(TGAN 119D)

10 Se disuelve 1 g de Gantrez AN 119 en 5 ml de dimetil-
formamida (DMF) y se agita fuertemente. Se añaden 0,3 g de
n-decilamina en 1 ml de DMF y la solución se vuelve más vis-
cosa. Después de agitar durante 10 minutos, la solución se
15 agrega gota a gota a una solución de 300 ml de tripsina bovi-
na en 60 ml de solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M
a pH 8,0, a 22°C. El pH se mantiene con hidróxido sódico 2 N
y, cuando ya no se produce ningún cambio, se añaden 4 g de
cloruro sódico. La suspensión resultante se vierte en 175 ml
de solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,6 y se
enfria a 4°C. Se añaden 50 g de sulfato amónico y la mezcla
20 se agita a 4°C durante 20 minutos. La mezcla se centrifuga
a 25.000 g y 4°C durante 1 hora y los gránulos gelatinosos
se homogeneizan de nuevo en 30 ml de solución reguladora de
fosfato sódico 0,1 M a pH 7,6. Se repite la centrifugación,
seguida de dos ciclos más de homogeneización/centrifugación
25 para dar 7,5 g de un gel suelto final. El preparado se ana-
liza espectrofotométricamente utilizando N-benzoil-L-arginin-
p-nitroanilida (BANA) 2 milimoles en solución reguladora de
veronal 0,1 M a pH 8,3 y a 22°C. Una unidad es un aumento de
la densidad óptica de 0,001 por minuto a 400 nm. Como el gel
30 produce una apreciable dispersión de la luz, es necesario sa-
cudir la cubeta (longitud de la trayectoria 1 cm) intermi-

1 tentemente.

Actividad del gel: 168 unidades/mg de peso húmedo, 2000 unidades/mg de peso seco (gel liofilizado)

Recuperación de actividad: 24,2 %.

5 La inmovilización del conjugado de enzima sobre las gotitas de disolvente es ilustrada mediante el siguiente experimento:

10 Se homogeneiza 1 g de peso húmedo de gel en un pequeño molino de tejidos con 2,5 ml de n-decano y 10 ml de solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 8,0, a 4000 rpm y 0°C durante 5 minutos. La suspensión lechosa se separa en una capa superior constituida por gotitas de decano compactamente aglomeradas y una capa acuosa inferior, a lo largo de 3 horas a 0°C. Ambas capas se analizan utilizando el método espectrofotométrico anterior. De nuevo la cubeta se sacude a intervalos regulares cuando se analiza la capa superior y se mide la velocidad media de aumento de la densidad óptica.

15 Actividad de la fase superior: 2280 unidades/ml

20 Actividad de la fase inferior: 57 unidades/ml.

25 Como la actividad aparente de la fase superior es probablemente mucho menor que la actividad real a causa del método, este resultado indica que por lo menos el 90 % de la actividad triptica está asociada a las gotitas de disolvente.

EJEMPLO 11

Penicilin-acilasa (n-octadecilamino-Gantrez AN 119)(PAGAN119C)

30 Se disuelven 0,5 g de Gantrez AN 119 en 2,5 ml de dimetilformamida y se calienta a 80°C en un baño de agua.

También se disuelven 0,28 g de octadecilamina en 2,5 ml de

1 dimetilformamida a 80°C y se añade rápidamente a la solución
de Gantrez mientras está todavía caliente. Se agita la mez-
cla y se agregan 0,1 ml de piridina. Después de enfriar a la
5 temperatura ambiente durante 1 hora, la solución completa se
agrega sobre 175 mg de penicilin-acilasa en 30 ml de agua a
pH 7,0 y se homogeneiza brevemente a 0°C.

La mezcla de color rosa se agita después a 0°C du-
rante 3 horas, manteniendo el pH a 4°C durante 16 horas, se
disuelven 5,8 g de cloruro sódico en la suspensión y la mez-
cla se centrifuga a 25.000 g y 0°C durante 1 hora. Los grán-
10 los resultantes de color rosa pesan 4,0 g y se suspenden de
nuevo en 20 ml de solución reguladora de fosfato sódico
0,1 M a pH 7,0. Empleando penicilina G al 5 % en peso/volu-
men en 20 ml de solución reguladora de fosfato sódico 0,02 M
15 a pH 7,8 y 25°C, esta suspensión tiene una actividad especí-
fica de $4,0 \times 10^{-5}$ moles/minuto/ml. Esto representa una recu-
peración de aproximadamente el 70 % de la actividad en el
conjugado. Se mezclan 4,0 ml de la suspensión anterior con
20 ml de solución reguladora de fosfato sódico 0,02 M y 5 ml
20 de n-decanol y se homogeneiza a unas 4000 rpm durante 5 minu-
tos a 0°C. La emulsión se centrifuga a 100 g y a la tempera-
tura ambiente durante 20 minutos y se separa en una emulsión
orgánica superior y una capa acuosa inferior. Se conserva la
capa acuosa y la capa superior se suspende de nuevo en 20 ml
25 de solución reguladora de fósforo sódico 0,02 M y se centri-
fuga otra vez. La capa inferior original contiene una acti-
vidad total de $1,25 \times 10^{-5}$ moles/minuto y la capa superior
lavada, $9,5 \times 10^{-5}$ moles/minuto. La relación de actividades
específicas (calculada en volumen) es 21,6 (superior/infe-
30 rior). Después de determinar la actividad por el método ante-

1 rior, la capa orgánica se recicla mediante suave centrifugación y separación de la capa acuosa como se indica en la Tabla V.

TABLA V

5 Porcentaje de actividad inicial de la fase PAGAN1190D-n-decanol en ciclos sucesivos de flotación-reutilización

<u>Ciclo nº</u>	<u>Actividad %</u>	<u>Ciclo nº</u>	<u>Actividad %</u>
1	80	7	46
2	86	8	46
10 3	93	9	44
4	73	10	42
5	64	11	45
6	47	12	43

EJEMPLO 12

15 Penicilin-acilasa (n-dodecilamino-Gantrez AN119) (PAGAN119DD)

Se disuelven 0,25 g de n-dodecilamino-Gantrez AN 119 en 1 ml de dimetilformamida y se añade a una solución de unos 100 mg de penicilin-acilasa en 14 ml de solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0.

20 Después de homogeneizar brevemente a 0°C, la suspensión se agita durante 16 horas a 4°C. Se añaden 7,8 g de sulfato amónico a la solución ahora homogénea a 4°C, manteniendo el pH en 7,0 con solución 1 M de carbonato sódico. Después de la solución del sulfato amónico, se forma una suspensión turbia. Este material se centrifuga a 25.000 g y 0°C durante 25 1 hora. Los gránulos se suspenden de nuevo en una solución de 7,8 g de sulfato amónico en 30 ml de agua a pH 7,0 y se centrifugan otra vez. Los gránulos finales pesan 1,36 g y se 30 redisuelven en 10 ml de agua para dar una solución viscosa. La actividad de los gránulos (analizada como antes) es

1 1,62 x 10⁻⁴ moles/minuto/g de peso húmedo, representando una recuperación de la actividad del 80 %. La inmovilización del conjugado soluble en agua sobre las gotitas de n-decanol es ilustrada mediante el siguiente experimento:

5 Se disuelve 1 ml de la solución anterior en 20 ml de solución reguladora de fosfato sódico 0,02 M y se homogeneiza con 10 ml de n-decanol a 4000 rpm durante 3 minutos a 0°C. La emulsión se separa en capas por centrifugación a 300 g durante 10 minutos. La capa superior tiene una actividad total de 1,14 x 10⁻⁵ moles/minuto y su actividad sobre ciclos sucesivos está indicada en la Tabla VI.

10

15

En un segundo experimento, se homogeneizan 2 ml de la solución de conjugado de enzima bajo las mismas condiciones con 2,5 ml de n-decanol y 10 ml de solución reguladora de fosfato sódico 0,02 M. Después de centrifugar y lavar con 20 ml de la misma solución reguladora, la capa superior tiene una actividad de 1,8 x 10⁻⁵ moles/minuto y la capa inferior original tiene una actividad de 8,0 x 10⁻⁶ moles/minuto. La relación de actividades específicas (superior/inferior, en volumen) es aproximadamente 7,5.

20

TABLA VI

Porcentaje de actividad inicial de la fase PAGAN119DD-n-decanol en ciclos sucesivos de flotación-reutilización

25

<u>Ciclo nº</u>	<u>Actividad, %</u>
1	96
2	66
3	66
4	53

30

EJEMPLO 13

Tripsina (n-octadecilamino-Gantrez AN 149 hidrolizado)
(TGAN149DCMC)

Se mezclan 15 g del gel polimérico hinchado con solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0 y se ajusta a pH 4,7 con ácido clorhídrico 2 N. Se añaden 0,5 g de meto-p-toluensulfonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodi-imida (CMC) y el pH se mantiene a 4,7 con HCl 2 N; después de 5 minutos a la temperatura ambiente, se añaden 75 mg de tripsi-
na bovina en 2 ml de solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0 y el pH de la mezcla se ajusta a 5,9 y se man-tiene en este valor durante la hora siguiente con hidróxido sódico 2 N. Al cabo de 3 horas a la temperatura ambiente, el gel se centrifuga a 25.000 g y 4°C durante 30 minutos. Los gránulos se suspenden de nuevo en 40 ml de solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0 y se centrifugan otra vez. Los gránulos finales se mezclan con 15 ml de la solución re-guladora anterior y 10 ml de n-decano y se homogeneizan bre-vemente. Este procedimiento produce una dispersión incomple-ta y la mezcla se sonifica a 20 KH en cinco sesiones de 5 mi-nutos con enfriamiento intermitente en hielo. La emulsión fi-nal se centrifuga a 100 g durante 15 minutos. La capa supe-rior se lava tres veces con 25 ml de la solución reguladora de fosfato. El volumen final de la capa superior es 11 ml y la capa tiene una actividad (análisis como en el Ejemplo 3) de 1050 unidades BANA/ml. Recuperación aparente de actividad: 5 % aproximadamente.

1

5

10

15

20

25

30

EJEMPLO 14

(a) n-Octadecilamino-Gantrez AN 119 hidrolizado-hidrazida
(GAN119ODH)

Se disuelven 5 g de Gantrez AN 119 en 20 ml de dimetilformamida y se calienta a 60°C en un baño de agua. Se añade una solución de 2,8 g de n-octadecilamina en 30 ml de dimetilformamida caliente (80°C) y la mezcla se mantiene a unos 60°C durante 1 hora. Después de enfriar a la temperatura ambiente, se añade la solución a una mezcla de 10 ml de hidrato de hidrazina y 50 ml de dimetilformamida a la temperatura ambiente. Se forma un ligero precipitado pardo, se agita la mezcla durante 10 minutos y se añaden 500 ml de agua. Se produce una solución verde jabonosa y, después de agitar durante 15 minutos, el pH se ajusta a 7,0 con HCl concentrado y se añaden 50 g de cloruro sódico. Se produce una floculación y la suspensión se centrifuga a 10.000 g y 4°C durante 30 minutos. Los gránulos se suspenden de nuevo en 400 ml de agua y se agitan durante 16 horas a 4°C y después se centrifugan como antes para dar 39 g (peso húmedo) de gránulos de color gris azulado.

(b) Penicilin-acilasa (n-octadecilamino-Gantrez AN 119)-hidrazida copulada, PAGAN119ODH

Se suspenden 5 g de peso húmedo de GAN119ODH en 50 ml de HCl 2 N y se agita a 0°C durante 15 minutos. Se añade una solución de 0,5 g de nitrito sódico en 5 ml de agua y la mezcla se agita a 0°C durante 10 minutos y después se centrifuga a 25.000 g y 0°C durante 30 minutos y los gránulos se suspenden de nuevo en solución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 8,0 (50 ml) a 0°C. Esta suspensión se agrega a 100 ml de una solución de penicilin-acilasa (conteniendo

1 55 mg de proteína) y se ajusta a pH 8,0. La suspensión se
agita a 4°C durante 72 horas y después se centrifuga a
25.000 g y 0°C durante 1 hora, se suspende de nuevo en so-
lución reguladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0 y se
5 vuelve a centrifugar. Peso de los gránulos finales: 3,74 g.
Actividad específica (análisis como antes): $5,2 \times 10^{-5}$ mo-
les/minuto/g. Recuperación de actividad: 32,5 %.

10 Una suspensión del conjugado anterior en solución re-
guladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0 (0,29 g/ml, 2,5 ml)
se mezcla con solución reguladora de fosfato sódico 0,02 M
a pH 7,8 (20 ml) y se homogeneiza con 7,5 ml de n-decanol
a 0°C durante 2 minutos. Centrifugando a 5000 rpm (100 g,
10 minutos) se obtienen dos capas: la capa inferior tiene
una actividad total de $1,8 \times 10^{-6}$ moles/minuto y la capa su-
15 perior, después de lavar con 20 ml de la solución reguladora
anterior, tiene una actividad de $1,9 \times 10^{-5}$ moles/minuto.
La relación de actividades específicas (superior/inferior,
en volumen) es aproximadamente 30. Los resultados de reci-
clar con la fase superior están indicados en la Tabla VII.

20

TABLA VII

Porcentaje de actividad inicial de la fase PAGAN119ODH-n-
decanol en ciclos sucesivos de flotación-reutilización

<u>Ciclo nº</u>	<u>Actividad, %</u>
1	90
25 2	84
3	74

30

EJEMPLO 15

Escisión enzimática de bencilpenicilina para producir ácido
6-aminopenicilánico

Se disuelven 1,0 g de Gantrez AN 119 en 10 ml de dimetilformamida y se añaden 0,56 g de octadecilamina. La mezcla se agita durante la noche a la temperatura ambiente.

Se ajustan a pH 9,0, empleando una solución de carbonato sódico 1 M, 48 ml de un preparado parcialmente purificado de penicilin-acilasa. Después se añade en dos partes alícuotas la solución de resina Gantrez, con homogeneización y ajuste de pH entre las dos adiciones. Luego la mezcla se agita durante 3 horas, manteniendo el pH a 9,0 mediante la adición de una solución de hidróxido sódico 1 M. El enzima-resina se recupera después por centrifugación, se suspende de nuevo en 120 ml de solución reguladora de fosfato 0,1 M a pH 7,0 y se homogeneiza durante 30 segundos. El enzima-resina se recupera por centrifugación y se repite el lavado.

Se homogeneizan 20 g del enzima-gel con 80 ml de n-decano y 20 ml de solución reguladora de fosfato 0,02 M a pH 7,8, durante 1 minuto. El homogeneizado se agrega sobre 250 ml de agua destilada. Toda la mezcla se calienta a 37°, se ajusta a pH 7,8 y se añaden 21,8 g de bencilpenicilina potásica. La mezcla se agita durante 5 horas y el pH se mantiene a 7,8 mediante la adición de una solución de hidróxido sódico al 4 % en peso/volumen. Al final de la reacción, la mezcla se introduce en un embudo de separación y se deja que el enzima se separe de la fase acuosa. Esto dura 30 minutos. Después se retira la fase acuosa y el ácido 6-aminopenicilánico se extrae de la siguiente forma. Se concentra el líquido hasta un cuarto de su volumen, se enfría

1 a 5º y se añade con agitación un volumen igual de metiliso-
butil-cetona. El pH se reduce a 4,3 por adición de ácido
nitríco concentrado, con lo que precipita el ácido 6-amino-
penicilánico. El sólido se recupera por filtración, se lava
5 con agua y acetona y se seca durante la noche a 40º. Se ob-
tienen 7,65 g de ácido 6-aminopenicilánico.

En las figuras adjuntas, la Figura 1 representa la liberación de la p-nitroanilina del N- α -benzoil-DL-arginin-p-nitroanilida por:

- 10 A. Tripsina (1mg)
B. Complejo Tripsina TFODHG.- 1(0,1g) del Ejemplo 6.

La Figura 2 representa la liberación del laureato p-nitrofenil-
lo catalizado por:

- 15 A. Lipasa (0,1g)
B. Complejo Lipasa LT2000 HDDG-1 (420mg).
del Ejemplo 7.

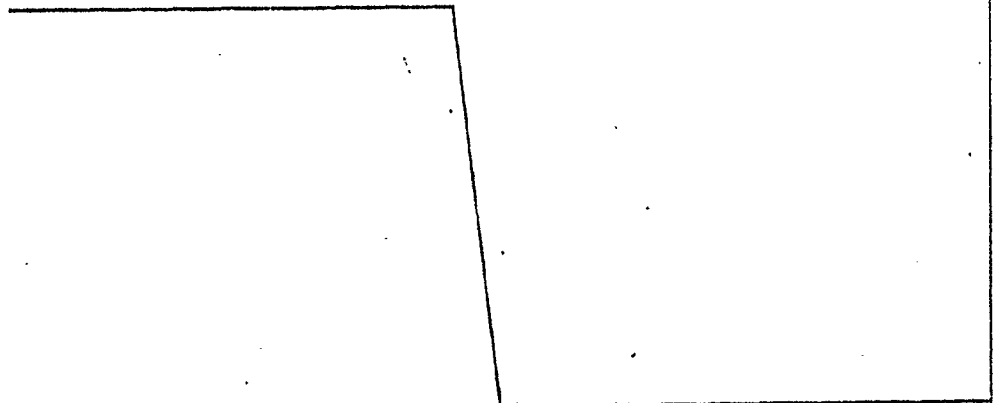
En la Figura 1, X es OD_{400}^1 cm ; T es el tiempo de incubación
en minutos.

20 En la Figura 2, X es OD_{400}^1 cm ; T es el tiempo de incubación
en minutos.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita
deberá recaer sobre las siguientes:

25

30



REIVINDICACIONES

1
5
1. Un procedimiento para la obtención de un preparado enzimático útil para efectuar transformaciones químicas que, opcionalmente, comprende un soporte polimérico y que contiene un enzima unido a grupos no polares suficientes para que, al poner en contacto el preparado en un medio acuoso con un líquido inerte no miscible con agua y resulte con ello separable del medio acuoso, cuyo procedimiento consiste en:

10 a) modificar, en su caso, el soporte polimérico y/o el enzima para incorporar el grupo no polar, y cuando sea necesario, el grupo formador de puente;

15 b) poner en contacto un compuesto de fórmula R-X, donde R es un grupo no-polar y X es un grupo funcional o un material polimérico que contiene por lo menos un grupo funcional (y que, opcionalmente puede ser modificado según la etapa (a)), con un enzima unido a un grupo Y donde Y es un grupo activo capaz de reaccionar con X, o un material polimérico que contiene por lo menos un grupo activo capaz de reaccionar con X.

20 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde X es un grupo amino.

25 3. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, donde X representa un material polimérico que contiene por lo menos un grupo funcional.

4. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se lleva a cabo en solución o suspensión acuosas.

5. Un procedimiento según la reivindicación 4, que se lleva a cabo a un pH comprendido entre 4 y 9.



30

1 6. Un procedimiento según la reivindicación 3, donde
se hace reaccionar un material polimérico que contiene gru-
pos anhídrido en el esqueleto del polímero con una amina de
fórmula $R.NH_2$ o R_2NH , en un disolvente aprótico polar no
5 acuoso, donde R es un grupo no polar, y posteriormente se
une el polímero modificado resultante a un enzima.

7. Un procedimiento según la reivindicación 6, donde
el disolvente aprótico no acuoso es N,N-dimetilformamida.

10 8. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde
el enzima está unido a un soporte polimérico.

9. Un procedimiento según la reivindicación 8, donde
el soporte polimérico es un material polisacárido.

10. Un procedimiento según la reivindicación 9, donde
el soporte polimérico es dextrano o Sepharose.

15 11. Un procedimiento según la reivindicación 8, donde
el soporte polimérico es un copolímero de un oligosacárido
y epíclorhidrina.

20 12. Un procedimiento según la reivindicación 11, don-
de el soporte polimérico es un copolímero de sacarosa y epi-
clorhidrina.

13. Un procedimiento según la reivindicación 8, donde
el soporte polimérico contiene grupos anhídrido en el esque-
leto del polímero.

25 14. Un procedimiento según la reivindicación 13, don-
de el soporte polimérico es un copolímero de éter metilviní-
lico y anhídrido maleico.

30 15. Un procedimiento según cualquiera de las reivin-
dicaciones 2 a 14, donde el enzima es amilasa, asparaginasa,
proteasa neutra o alcalina, quimotripsina, celulasa, dextra-
nasa, lipasa, oxinitrilasa, pepsina, penicilin-acilasa o trip

1 sina.

16. Un procedimiento según la reivindicación 15, donde el enzima es penicilin-acilasa.

5

17. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 16, donde el grupo no polar es un grupo alquilo C_6-C_{30} , alquenilo C_6-C_{50} , cicloalquilo C_6-C_{20} , arilo, arilo sustituido o aralquilo.

18. Un procedimiento según la reivindicación 17, donde el grupo no polar es un grupo alquilo C_6-C_{30} .

10

19. Un procedimiento según la reivindicación 18, donde el grupo no polar es n-decilo, n-dodecilo o n-octadecilo.

15

20. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 19, donde un grupo formador de puente liga el enzima al soporte polimérico y/o el enzima al grupo no polar y/o el soporte polimérico al grupo no polar.

21. Un procedimiento según la reivindicación 20, donde el grupo formador de puente deriva de una α, ω -diamina alifática C_2-C_{10} y/o un dialdehído soluble en agua.

20

22. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 19, donde el enzima está ligado directamente al soporte polimérico.

25

23. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UN PREPARADO ENZIMÁTICO UTIL PARA EFECTUAR TRANSFORMACIONES QUIMICAS.

30

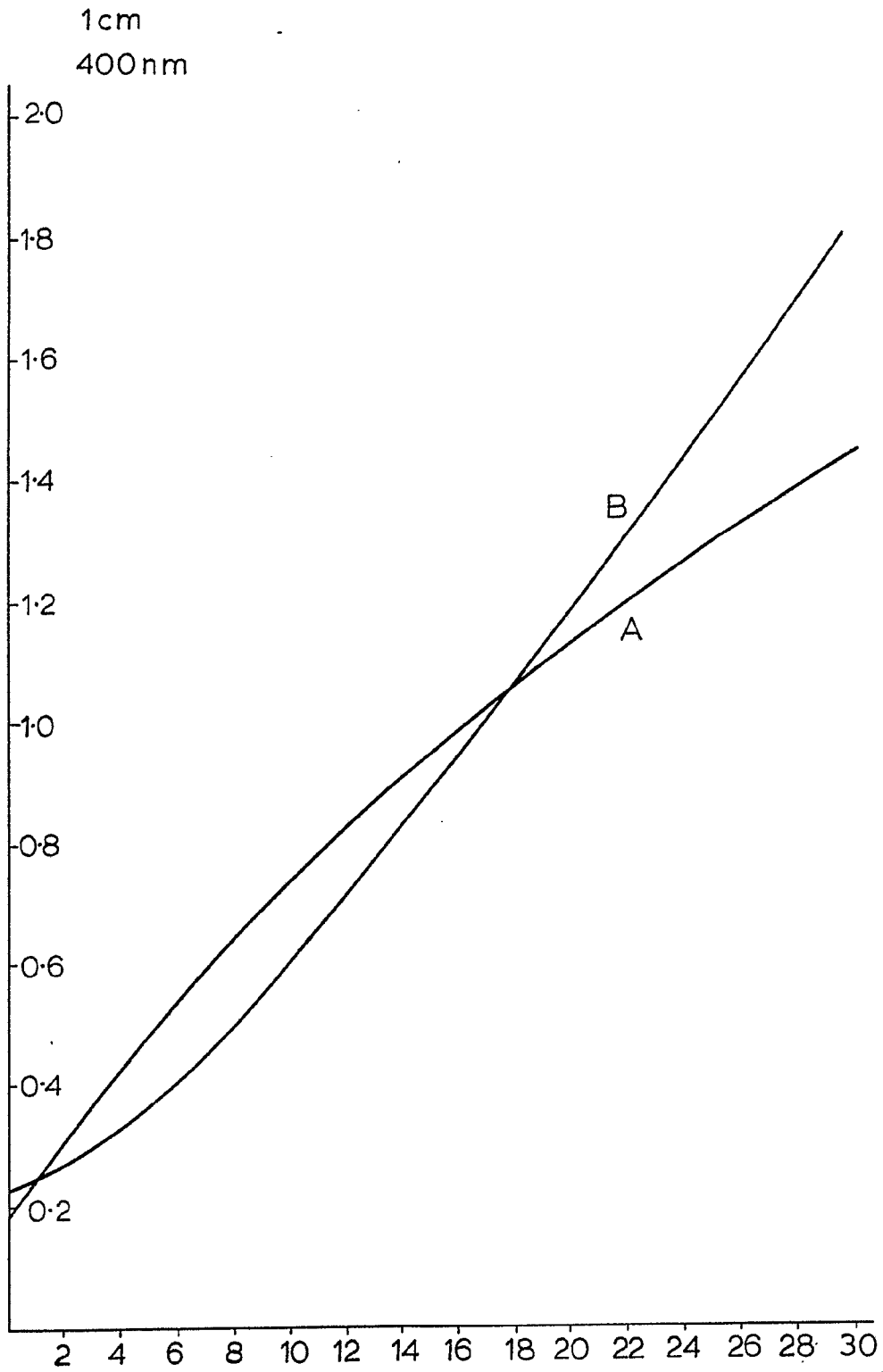
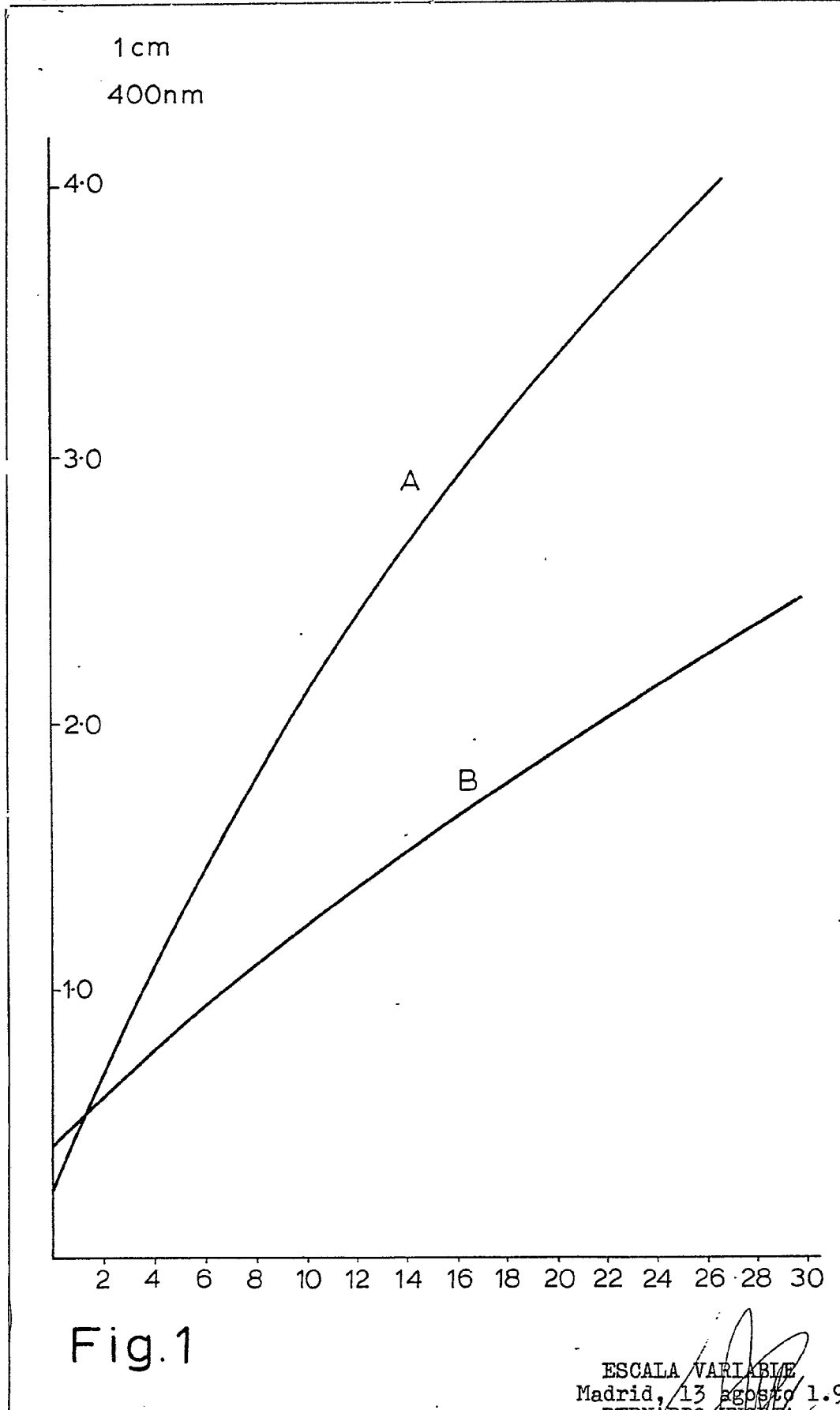


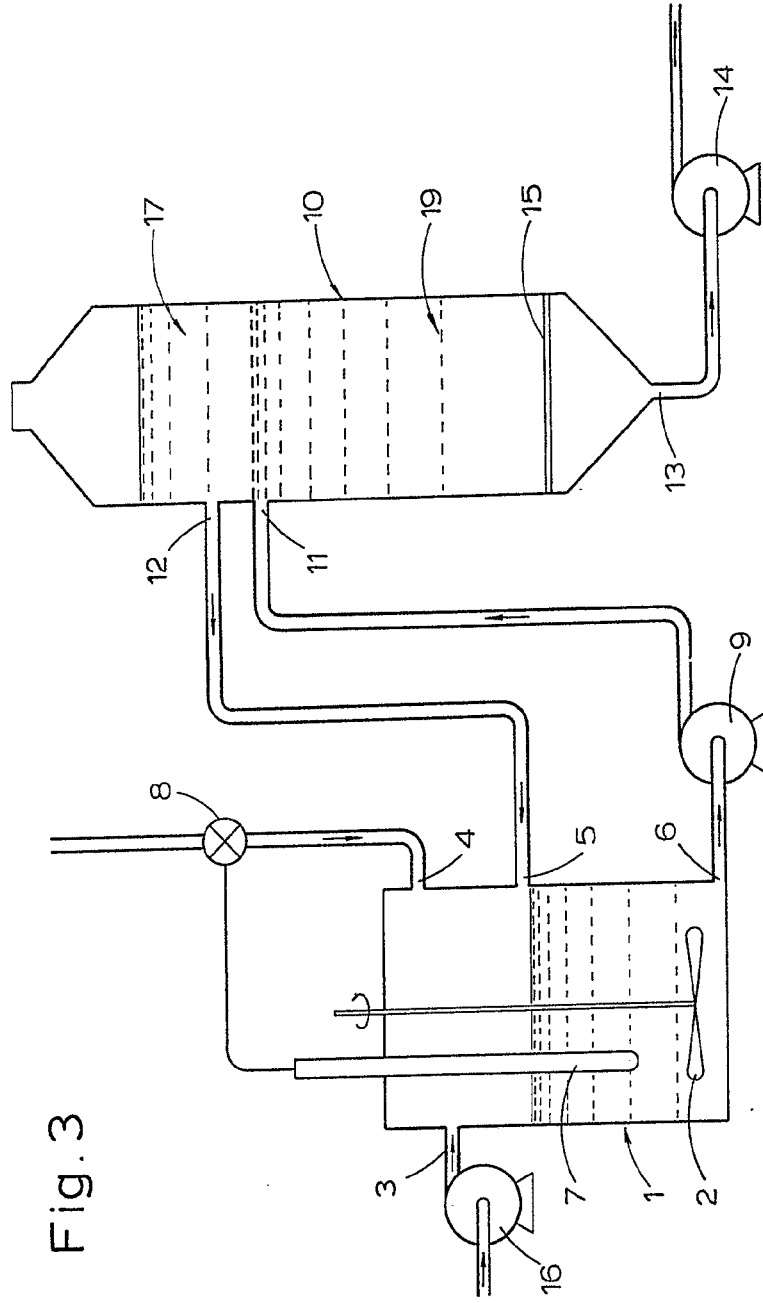
Fig. 2

ESCALA VARIABLE
Madrid, 13 agosto 1.975
BERNARDO UÑERUA
p.p.



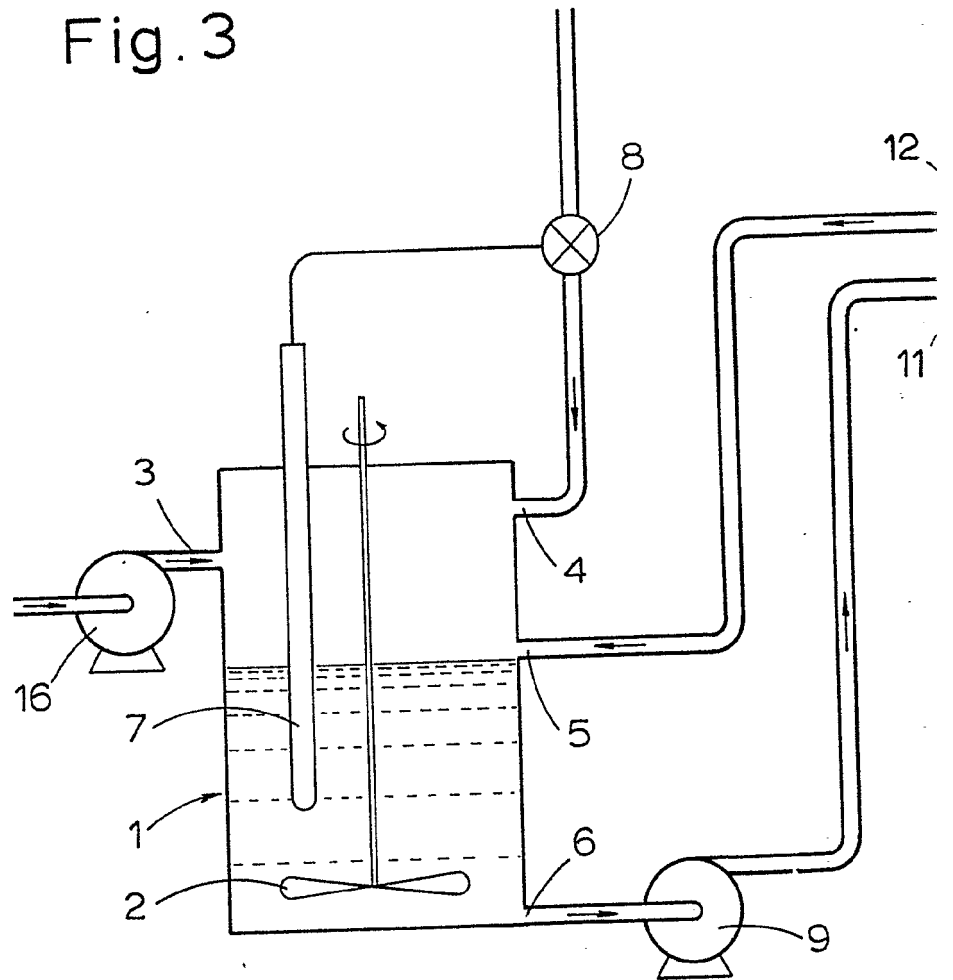
ESCALA VARIABLE
Madrid, 13 agosto 1.975
BERNARDO UNGRÍA
P.P.

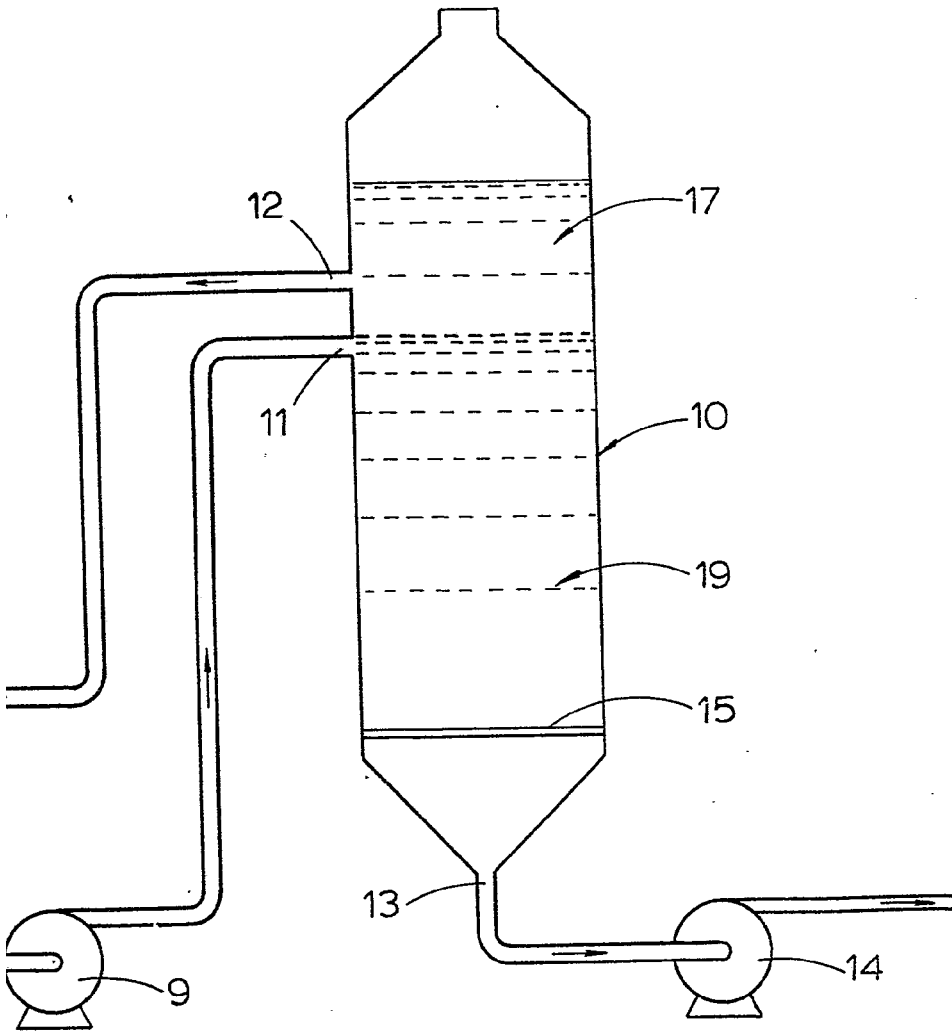
Fig. 3



ESCALA VARIABLE
Madrid, 13 agosto 1.975
BERNARDO UNGUITA
P.P.

Fig. 3





ESCALA VARIABLE
Madrid, 13 agosto 1.975
BERNARDO UNGRÍA
p.p.