

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

19	ES	21	445248	20	A1
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			17-2-1.976		

PATENTE DE INVENCION

P.- 62.415

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
550.898	18-2-75	EE.UU.
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07G	
64 TITULO DE LA INVENCION		
"UN METODO PARA PREPARAR UN CONJUGADO DE ENZIMA INMOVILIZADA"		
71 SOLICITANTE (S)		
UOP INC.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Ten UOP Plaza, Algonquin & Mt. Prospect Roads, Des Plaines, Illinois, Estados Unidos de America.		
72 INVENTOR (ES)		
Joseph Levy y Murray Campbell Fusee		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON ALBERTO DE ELIZABURU MARQUEZ		

LFG/

**POOR
QUALITY**

Es sabido que las enzimas, que son de naturaleza proteínica y que comúnmente son solubles en agua, constituyen catalizadores biológicos que sirven para regular muchas y variadas reacciones químicas que se desarrollan en organismos vivos. Las enzimas pueden también ser aisladas y utilizadas en aplicaciones analíticas, médicas e industriales. Por ejemplo, encuentran utilización en aplicaciones industriales para la preparación de productos alimenticios tales como queso o pan, y también son utilizadas en la preparación de bebidas alcohólicas. Se pueden encontrar algunas utilizaciones específicas en la industria en la utilización de enzimas tales como en el desdoblamiento o resolución de aminoácidos; en la modificación de penicilina para formar diversos substratos para la misma; la utilización de diversas proteasas en la fabricación de queso, en el ablandamiento de carnes, en formulaciones detergentes, en la fabricación de cueros y como auxiliares digestivos; la utilización de carbohidrasas en la hidrólisis de almidón, inversión

de sacarosa, isomerización de glucosa, etc; la utilización de nucleasas para el control del sabor; o la utilización de oxidasas para evitar la oxidación y en el control del color de productos alimenticios. Estas utilidades, así como muchas otras, han sido bien explicadas en la bibliografía.

Tal como se indica anteriormente, toda vez que las enzimas son comúnmente solubles en agua y generalmente son inestables e inactivadas con facilidad, son difíciles de retirar de las soluciones en las que son utilizadas para subsiguiente nueva utilización o es difícil mantener su actividad catalítica durante un período de tiempo relativamente extenso. Desde luego, las dificultades antes mencionadas conducirán a un costo acrecentado en la utilización de enzimas para fines comerciales debido a la necesidad de reemplazar con frecuencia la enzima, siendo necesario usualmente este reemplazamiento con cada uso. Para contrarrestar el alto costo de reemplazamiento, se ha sugerido inmovilizar o insolubilizar las enzimas antes de su utilización. Inmovilizando las enzimas mediante diversos sistemas, que se indican seguidamente con mayor detalle, es posible estabilizar las enzimas de una manera relativa y, por lo tanto, permitir la nueva utilización de la enzima, que en caso contrario

1 puede experimentar inactivación o puede perderse en
el medio de reacción. Dichas enzimas inmovilizadas o
insolubilizadas pueden ser empleadas en diversos sis-
temas de reactores tales como columnas rellenas, reac-
5 tores de depósitos con agitación, etc., dependiendo
de la naturaleza del sustrato que se utiliza en ellos.
En general, la inmovilización de las enzimas propor-
ciona una estabilidad ambiental más favorable o más
amplia, un mínimo de problemas de flúidos salientes y
10 de manipulación de materiales, así como la posibilidad
de aumentar la actividad de la enzima propiamente di-
cha.

Tal como se indica con anterioridad, se han
descrito varios métodos generales, así como muchas mo-
15 dificaciones de los mismos, mediante los cuales se
puede efectuar la inmovilización de enzimas. Un méto-
do general consiste en adsorber la enzima en una su-
perficie sólida tal como, por ejemplo, cuando una en-
zima tal como una acilasa de aminoácido es adsorbida
20 sobre un derivado celulósico tal como DEAE-celulosa;
la papaína o ribonucleasa es adsorbida sobre vidrio
poroso; la catalasa es adsorbida sobre carbón vege-
tal; la tripsina es adsorbida sobre vidrio de cuarzo
o celulosa; la quimotripsina es adsorbida sobre caoli-
25 nita, etc. Otro método general consiste en ocluir una

enzima en un retículo de gel; por ejemplo la glu-
cosa-oxidasa, ureasa, papaína, etc., que son oclui-
das en un gel de poliacrilamida; la acetil-colines-
terasa que es ocluida en un gel de almidón o un po-
5 límero de silicona; la glutámico-pirúvico-transami-
nasa que es ocluida en un gel de poliamida o de ace-
tato de celulosa, etc. Otro método general consiste
en una reticulación mediante reactivos bifunciona-
les y puede efectuarse en combinación con uno cual-
10 quiera de los métodos generales de inmovilización
antes mencionados. Cuando se utiliza este método,
los reactivos bifuncionales o polifuncionales que
pueden inducir una reticulación intermolecular fija-
rán de modo covalente las enzimas entre sí así co-
15 mo también a un soporte sólido. Este método puede
ser ilustrado por la utilización de glutarodialde-
hído o ácido bisdiazobenzidino-2,2'-disulfónico pa-
ra fijar una enzima tal como papaína a un soporte
sólido. Todavía otro método de inmovilizar una enzi-
20 ma comprende el método de una fijación covalente en
el que enzimas tales como glucoamilasa, tripsina,
papaína, pronasa, amilasa, glucosa-oxidasa, renina,
proteasa fúngica, lactasa, etc., son inmovilizadas
por fijación covalente a un material polímero que es
25 fijado a un soporte poroso sólido orgánico o inorgá-

nico. Este método puede también ser combinado con los antedichos métodos de inmovilización.

5 Los métodos antes enumerados de inmovilizar enzimas poseen todos ellos algunas desventajas, que hacen desmerecer su utilización en procedimientos industriales. Por ejemplo, cuando una enzima es adsorbida directamente sobre la superficie de un soporte, las fuerzas de unión que resultan entre la enzima y el soporte de vehículo son con frecuencia bastante débiles, si bien alguna referencia de la técnica anterior ha indicado que se han obtenido conjugados relativamente estables de este tipo cuando el tamaño de poros del soporte y el diámetro de rotación corpuscular de la enzima están correlacionados. No obstante, el tamaño de poros del soporte no puede exceder de un diámetro de aproximadamente 1.000 Angstroms. A la vista de esta débil unión, la enzima es con frecuencia desorbida con facilidad en la presencia de soluciones del substrato que está siendo sometido a tratamiento. Además de esto, la enzima puede ser inactivada parcial o extensamente debido a su carencia de movilidad o debido a la interacción entre el soporte y el lugar activo de la enzima. Otro procedimiento que puede emplearse es la oclusión de enzimas en retículos de gel que se

10

15

20

25

puede efectuar polimerizando una solución o emulsión acuosa que contiene la forma monómera del polímero y la enzima, o incorporando la enzima en el polímero previamente formado mediante diversas técnicas, con frecuencia en la presencia de un agente de reticulación. Si bien este método de inmovilizar enzimas tiene una ventaja en el hecho de que las condiciones de reacción utilizadas para efectuar la oclusión son usualmente suaves y que frecuentemente hay poca alteración o inactivación de la enzima, también tiene desventajas por el hecho de que el conjugado tiene mala resistencia mecánica, lo cual da como resultado una consolidación cuando se utiliza en columnas en sistemas de circulación continua, con una consiguiente obstrucción de la columna. Dichos sistemas tienen variaciones bastante amplias en el tamaño de poros, conduciendo de este modo a algunos tamaños de poros que son suficientemente grandes para permitir la pérdida de enzima. Además de ello, algunos tamaños de poros pueden ser suficientemente pequeños de manera que grandes barreras de difusión al transporte del sustrato y del producto conducirán a un retardo de la reacción, ocurriendo esto especialmente cuando se utiliza un sustrato de peso molecular alto.

Las desventajas que se presentan cuando se inmoviliza una enzima por reticulación intermolecular, tal como ya se ha hecho observar, son debidas a la carencia de movilidad con inactivación resultante a causa de la incapacidad de la enzima para adoptar la configuración natural necesaria para obtener una actividad máxima, particularmente cuando el lugar activo está implicado en el proceso de fijación o unión.

Los métodos de fijación o unión covalente han encontrado amplias utilizaciones y pueden ser usados como la única técnica de inmovilización o como una parte integrante de muchos de los métodos ya descritos en los que se emplean reacciones de reticulación. Este método se utiliza con frecuencia para fijar la enzima así como también el soporte mediante una molécula intermedia bifuncional en que los grupos funcionales de la molécula, tales como, por ejemplo, gamma-aminopropiltriétoxissilano, son capaces de reaccionar con radicales funcionales presentes tanto en la enzima y en un soporte poroso orgánico o inorgánico. Se han empleado de esta manera una amplia variedad de reactivos y soportes y el método tiene la ventaja de proporcionar fuertes enlaces covalentes por todo el producto conjugado así como una

gran actividad en muchos casos. La unión covalente de la enzima con el vehículo debe lograrse mediante grupos funcionales situados sobre la enzima que no son esenciales para su actividad catalítica tales como grupos amino libres, grupos carboxilo, grupos hidroxilo, grupos fenólicos, grupos sulfhidrilo, etc. Estos grupos funcionales reaccionarán también con una amplia variedad de otros grupos funcionales tales como grupos aldehído, isocianato, acilo, diazo, azido, anhídrido, éster activado, etc., para producir enlaces covalentes. No obstante, este método tiene con frecuencia muchas desventajas que implican reaccionantes y disolventes costosos, así como también soportes porosos especiales y costosos y métodos complicados de múltiples etapas, que hacen antieconómico al método de preparación para su utilización a escala comercial.

La técnica anterior está por lo tanto repleta de diversos métodos para inmovilizar enzimas, los cuales, sin embargo, fallan de muchas maneras en cumplir los requisitos de una utilización industrial. No obstante, tal como se describirá seguidamente con mayor detalle, ninguna de las composiciones de la técnica anterior comprende la composición de materia del presente invento que constituye un sopor-

te poroso inorgánico que contiene un material polí-
mero formado "in situ" a partir de un monómero o un
polímero previamente formado, de origen natural o
sintético, que está ocluido y también adsorbido en
5 parte dentro de los poros de dicho soporte y que con-
tiene grupos colgantes, funcionalizados, que se ex-
tienden desde ellos; siendo la enzima parcialmente
adsorbida junto a la matriz y también unida covalente-
mente con los radicales activos en o adyacentemente a
10 porciones terminales de los grupos colgantes, permi-
tiendo de este modo la libertad de movimientos que ha-
rá posible que la enzima ejerza una actividad máxima.
Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos número
3.556.945 se refiere a cuerpos compuestos enzimáticos
15 en los cuales la enzima está adsorbida directamente
junto a un soporte o vehículo inorgánico tal como vi-
drio. La patente de los Estados Unidos número
3.519.538 concierne a cuerpos compuestos enzimáticos
en los cuales las enzimas están acopladas químicamen-
20 te, mediante un agente de acoplamiento de silano in-
termedio, con un soporte inorgánico. De manera simi-
lar, la patente de los Estados Unidos número 3.783.101
utiliza también un cuerpo compuesto de organosilano
como agente de unión, siendo acoplada la enzima co-
25 valentemente con un soporte de vidrio por medio de

un agente de acoplamiento de silano intermedio, siendo fijada al soporte la porción de silicona del agente de acoplamiento, mientras que la porción orgánica del agente de acoplamiento es acoplada con la enzima, conteniendo la composición un óxido metálico sobre la superficie del soporte dispuesto entre el soporte o vehículo y la porción de silicona del agente de acoplamiento. En la patente de los Estados Unidos número 3.821.083 el soporte o vehículo inerte es recubierto con un polímero previamente formado tal como poliacroleína que tiene unido con él una enzima. No obstante, de acuerdo con la mayor parte de los ejemplos indicados en la patente, es necesario primero hidrolizar en medio ácido el cuerpo compuesto antes de depositar la enzima sobre el polímero. Otra patente de la técnica anterior, a saber la patente de los Estados Unidos 3.705.084 describe un reactor macroporoso con enzima en el cual una enzima es adsorbida sobre la superficie polímera de un núcleo de reactor macroporoso y después de ello es reticulada en el mismo lugar de reacción. Reticulando las enzimas sobre la superficie polímera después de adsorción de ellas, la enzima es inmovilizada adicionalmente en parte y no puede actuar libremente como en su estado original en calidad de catalizador. La reticulación de enzimas las une en efecto entre sí,

impidiendo de este modo un movimiento libre de la enzima y disminuye la movilidad de la enzima, que es un requisito previo necesario para obtener una máxima actividad.

5 Este invento se refiere a nuevas composiciones de materia que comprenden conjugados de enzimas inmovilizadas. Más específicamente, el invento concierne a nuevas composiciones de materia que comprenden un conjugado de enzima inmovilizada que
10 consiste en una matriz orgánica-inorgánica que constituye un material de soporte poroso inorgánico que contiene un material polímero orgánico que ha sido formado "in situ" a partir de un monómero, un polí-
15 mero hidrolizado, o un polímero previamente formado, de origen natural o sintético, por reacción con un monómero bifuncional que contiene radicales reactivos apropiados. Dicho material polímero está tanto ocluido
20 como adsorbido en los poros del antedicho material de soporte, y además está provisto con grupos colgantes funcionalizados que se extienden desde él, estando colocados los radicales funcionales en o ad-
25 yacentes a las porciones terminales del mismo, y una enzima que a la vez está unida covalentemente con dichos grupos colgantes funcionalizados y también está adsorbida en parte sobre la matriz orgánica-inor-

gánica.

Tal como se indica anteriormente, la utilización de enzimas en aplicaciones analíticas, médicas o industriales puede ser acrecentada grandemente si tales enzimas se encuentran en un estado inmovilizado, es decir que dichas enzimas por estar en combinación con otros materiales sólidos, están a su vez de un estado en el que no son solubles en agua y por lo tanto pueden ser sometidas a utilización repetida al tiempo que mantienen la actividad catalítica de tal enzima. Con el fin de estar presentes en un estado inmovilizado, las enzimas deben ser unidas o fijadas de alguna manera con un soporte insoluble en agua, siendo de este modo utilizables comercialmente en un estado no soluble en agua.

Por lo tanto, un objeto de este invento es crear nuevas composiciones de materia en las cuales estén presentes enzimas en un estado inmovilizado.

Otro objeto de este invento es crear composiciones de materia en las cuales una enzima esté a la vez adsorbida sobre una matriz orgánica-inorgánica y unida covalentemente con grupos colgantes - funcionalizados, esté fijada a dicha matriz que, a su vez, esté también adsorbida y ocluida en los

poros del material de soporte poroso inorgánico.

5 En un aspecto, una forma de realización de este invento consiste en un conjugado de enzima inmovilizada que comprende una matriz orgánica-inorgánica combinada que consiste en un soporte poroso inorgánico que contiene un material polímero orgánico adsorbido y ocluido en los poros de dicho soporte, conteniendo dicho material polímero grupos colgantes funcionalizados, y una enzima adsorbida junto a dicha matriz y unida covalentemente con los radicales funcionales de dichos grupos colgantes de dicho material polímero orgánico en o adyacentemente a las porciones terminales del mismo.

10 Una forma de realización específica de este invento se encuentra en un conjugado de enzima inmovilizada que comprende una matriz orgánica-inorgánica que consiste en un soporte de sílice-alúmina poroso, de baja densidad aparente, con superficie específica relativamente alta, que puede contener también aditivos inorgánicos y un material polímero de tetraetilenopentamina-glutaraldehído preparado "in situ" que está adsorbido así como también ocluido en los poros de dicha sílice-alúmina, y una enzima que comprende glucoamilasa que está unida covalentemente con los grupos colgantes de glutaraldehído del

material polímero en o adyacentemente a la porción terminal de dichos grupos y también está adsorbida en parte sobre la matriz.

5 Otros objetos y formas de realización se encontrarán en la siguiente descripción detallada adicionalmente del presente invento.

10 Tal como se indica aquí anteriormente, el presente invento concierne a conjugados de enzimas inmovilizadas que comprenden una matriz orgánica-inorgánica combinada que consiste en un material de soporte poroso inorgánico que contiene un material polímero orgánico adsorbido y ocluido en los poros de dicho soporte poroso inorgánico. Además, el material polímero contendrá grupos colgantes, teniendo dichos grupos colgantes una enzima que está unida covalentemente con dichos grupos en o adyacentemente a las porciones terminales de los mismos y, además, dicha enzima está también parcialmente adsorbida sobre dicha matriz. A diferencia de las composiciones de materia que contienen enzimas inmovilizadas, tal como se mencionan en la técnica anterior, las composiciones de materia de este invento pueden ser preparadas utilizando reaccionantes relativamente baratos así como también utilizando operaciones más simples en el método para preparar tales composiciones. Además, la re-

15

20

25

sistencia mecánica y la estabilidad de los conjugados de enzimas del presente invento serán mayores que la que son poseídas por las enzimas inmovilizadas de la técnica anterior. Por lo tanto, es evidente con facilidad que las composiciones de materia del presente invento poseen ventajas económicas que son útiles para aplicaciones industriales.

Las composiciones de materia del presente invento pueden ser preparadas de una manera relativamente simple. En el método preferido de preparación, el material de soporte poroso inorgánico será tratado con una solución, preferiblemente de naturaleza acuosa, de un monómero bifuncional o polifuncional, un hidrolizado de polímero o un polímero previamente formado, después de lo cual la solución no adsorbida es eliminada por cualquier método conocido en la técnica tal como evacuación, etc. También se considera que pueden utilizarse otros disolventes orgánicos baratos tales como acetona, tetrahidrofurano, etc., como el soporte para los monómeros o polímeros antes mencionados. Después de la eliminación de la solución no adsorbida, el soporte poroso húmedo es puesto en contacto luego con un exceso relativamente grande de 5 a 20% en moles de un segundo monómero bifuncional en el que los grupos reac-

tivos están separados preferiblemente por una cadena que contiene de 4 a 10 átomos de carbono, siendo también añadido este segundo monómero bifuncional en una solución acuosa, con lo cual se formará una matriz polímera que a la vez está adsorbida y ocluida en los poros del soporte, y desde la cual se extenderán grupos colgantes del segundo monómero. Estos grupos colgantes contendrán radicales funcionales sin reaccionar debido al hecho de que se había empleado una cantidad en exceso del segundo monómero bifuncional para tratar el soporte. Los radicales funcionales sin reaccionar están entonces disponibles para unirse covalentemente con la enzima, que es añadida a la matriz orgánica-inorgánica resultante, asimismo usualmente en una solución acuosa. Después de eliminación de los materiales sin reaccionar por ejemplo por tratamiento, lavado, etc., la enzima, además de estar unida covalentemente con los grupos funcionalizados colgantes en o adyacentemente a las porciones terminales de los mismos, estará también en parte adsorbida a la matriz. Por lo tanto es evidente con facilidad que todo el método de inmovilización se puede realizar de una manera simple y barata utilizando un medio disolvente acuoso o barato, siendo realizado el procedimiento a lo largo de una diferencia de tempera-

turas que puede oscilar desde menos de la ambiente (aproximadamente 5°C) hasta temperaturas elevadas de aproximadamente 60°C, y preferiblemente a la temperatura ambiente (alrededor de 20-25°C), efectuándose dicho procedimiento con utilización de un mínimo de operaciones de tratamiento y permitiendo además una fácil recuperación de los reaccionantes en exceso y de la composición de materia terminada.

Muchos de los soportes inorgánicos mencionados en la técnica anterior especifican materiales con "poros controlados" tales como vidrio, alúmina, etc., que tienen un diámetro de poros de 500 a 700 Angstroms para aproximadamente 96% del material y un diámetro máximo de poros de 1.000 Angstroms, una superficie específica de 40-70 m²/g y partículas con un tamaño de mallas 40-80. Además, estos soportes pueden estar recubiertos con óxidos metálicos, tales como óxido de zirconio y óxido de titanio para tener una mayor estabilidad. A diferencia de estos soportes, se considera dentro del alcance de este invento que los soportes porosos inorgánicos, que se utilizan en él, constituirán materiales que poseen diámetros de poros que oscilan entre 100 Angstroms y 55.000 Angstroms poseyendo hasta un 25-60% del material de soporte poroso unos poros con diámetros superiores a 20.000 Angstroms

y superficies específicas que oscilan entre 150 y 200 m²/g. El tamaño de partículas puede variar también a lo largo de un amplio margen de desde mallas 10 - 20 hasta un polvo fino, dependiendo dicho tamaño de partículas del sistema particular en que éstas han de ser utilizadas. Se considera también que los materiales de soporte porosos pueden estar recubiertos con diversos óxidos del tipo mencionado aquí con anterioridad o pueden tener incorporados en ellos otros diversos materiales inorgánicos diferentes tales como fosfato de boro, etc., comunicando estos materiales inorgánicos propiedades especiales al material de soporte. Una forma particularmente útil del soporte constituirá un cuerpo cerámico que puede tener el tipo de porosidad aquí descrito para materiales del presente invento, o puede estar alveolado con canales conectadores de gran tamaño a lo largo de su masa, siendo conocidos dichos materiales comúnmente como monolitos, y que puede estar recubierto con diversos tipos de alúmina, óxido de zirconio, porosos, etc. La utilización de tal tipo de soporte tiene la ventaja particular de permitir la libre circulación de substratos incluso altamente viscosos, que con frecuencia aparecen en reacciones comerciales catalizadas con enzimas.

Los materiales de soporte porosos inorgánicos que se utilizan como un componente de la matriz orgánica-inorgánica combinada, incluirán ciertos óxidos metálicos tales como alúmina y particularmente gamma-alúmina, sílice, óxido de zirconio, o mezclas de los óxidos metálicos, tales como sílice-alúmina, sílice-óxido de zirconio, sílice-magnesia, sílice-óxido de zirconio-alúmina, etc., o gamma-alúmina que contiene otros compuestos inorgánicos tales como fosfato de boro etc., cuerpos cerámicos, etc., así como también combinaciones del material antes mencionado, constituyendo el soporte uno de dichos materiales que puede servir como un recubrimiento para otro material.

Los materiales polímeros que son formados "in situ" de manera tal que el material polímero esté a la vez adsorbido parcialmente y ocluido parcialmente en los poros del soporte inorgánico del tipo antes mencionado, se pueden producir de acuerdo con los métodos generales descritos aquí con anterioridad, es decir primero adsorbiendo una solución que contiene de 2 a 25% de un monómero bifuncional o polifuncional, un hidrolizado polímero o un polímero previamente formado, siendo el monómero o el polímero de origen sintético o natural, y siendo preferiblemente solubles en agua o en otros disolventes que son inertes para las reaccio-

nes subsiguientemente empleadas. Tal como se indica aquí con anterioridad, está considerado dentro del alcance de este invento que un segundo monómero bifuncional es añadido luego de manera similar para formar una matriz orgánica-inorgánica por reacción con el aditivo original adsorbido sobre el soporte inorgánico. Los grupos funcionales que están presentes sobre el monómero bifuncional comprenderán radicales reactivos bien conocidos tales como radicales amino, hidroxilo, carboxi, tiol, carbonilo, etc. Tal como se indicó también aquí con anterioridad, los grupos reactivos de los compuestos bifuncionales están separados preferiblemente, pero no necesariamente, por cadenas que contienen de 4 a 10 átomos de carbono. Los radicales reactivos son capaces de unirse de modo covalente con los aditivos iniciales y subsiguientemente, después de eliminar por lavado materiales no reaccionados, con la enzima que ha de ser añadida en una operación subsiguiente, siendo entonces dicha enzima unida covalentemente con el grupo funcional en o adyacentemente a la porción terminal de la cadena funcional así como también simultáneamente adsorbido sobre la matriz. Después de adición de la enzima a esta composición, se producirá un conjugado de enzima relativamente estable que posee alta actividad y alta estabilidad. Además,

la composición de materia del presente invento posee también apreciable versatilidad además de las otras ventajas anteriormente enumeradas, por el hecho de que puede ser empleada para preparar conjugados en la ausencia de un soporte inorgánico, los cuales son solubles en medios ácidos o en medios alcalinos. Tal como se indicará seguidamente con mayor detalle, dependiendo de los reaccionantes empleados, los conjugados retendrán su estabilidad en dichos medios cuando sean preparados en combinación con el soporte inorgánico de acuerdo con los procedimientos indicados en la técnica anterior. Por poseer estas propiedades, es posible ampliar las utilizaciones para las que se pueden emplear estos conjugados.

Ejemplos específicos de monómeros bifuncionales o polifuncionales, hidrolizados polímeros o polímeros previamente formados que pueden estar adsorbidos inicialmente sobre el soporte inorgánico incluirán poliaminas solubles en agua tales como etilendiamina, dietilentriamina, tristilentetramina, tetraetilenpentamina, pentaetilenhexamina, hexametilendiamina, polietilenimina, etc.; poliaminas insolubles en agua tales como metilendiciclohexilamina, metilendianilina, etc.; polímeros naturales y sintéticos parcialmente hidrolizados, y polímeros previamente

formados tales como nylon, colágeno, poliacroleína, polianhídrido maleico, ácido algínico, hidrolizado de caseína, gelatina, etc. Algunos ejemplos específicos de materiales bifuncionales intermedios que pueden ser añadidos a los productos antes enumerados para producir una matriz orgánica-inorgánica y que poseen las características necesarias indicadas aquí como anterioridad, incluyen compuestos tales como glutarodialdehído, cloruro de adipóilo, cloruro de sebacoilo, toluenodisocianato, hexametilendisocianato, etc. Se observará que cuando una polietilenamina del tipo aquí indicado con anterioridad es hecha reaccionar con glutarodialdehído en la ausencia de un soporte poroso inorgánico, se obtiene un material soluble ácido acuoso, mientras que cuando una polietilenamina es hecha reaccionar con un diisocianato o un halogenuro de acilo, se obtiene un producto insoluble en agua. Inversamente, si un complejo de reacción sin el soporte inorgánico contiene grupos carboxilo libres, se puede obtener un complejo soluble alcalino. Debido al gran exceso de moléculas bifuncionales intermedias, o distanciadoras, que se utilizan, la matriz polimera que se forma contendrá grupos colgantes que comprenden las moléculas distanciadoras, extendiéndose dichas moléculas desde la matriz y tenien-

do radicales reactivos disponibles en o adyacentemen-
te a las porciones terminales de las mismas que son
capaces de reaccionar con la enzima, y de fijarla a
las moléculas distanciadoras mediante enlaces cova-
lentes. Además, la enzima, cuando es empleada después
de que los reaccionantes que no han reaccionado hayan
sido retirados de la matriz orgánica-inorgánica por
lavado, experimentará también simultáneamente adsor-
ción en parte con dicha matriz. El hecho de fijar la
enzima solamente a la matriz orgánica no afectará
usualmente a la dependencia de la solubilidad del aglo-
merado con respecto del pH de la solución, pero cuan-
do el soporte inorgánico es incluido tal como se des-
cribe aquí con anterioridad, el conjugado total ex-
hibe alta estabilidad a lo largo de un margen de pH
relativamente amplio de 3 a 9, siendo también, desde
luego, la estabilidad una función de las caracterís-
ticas óptimas de pH de la enzima particular empleada
así como también del soporte inorgánico utilizado.
Por lo tanto, es evidente con facilidad que se formará
una matriz orgánica-inorgánica apropiada que sea apli-
cable en muchos casos con el material de soporte ad-
sorbiendo uno cualquiera del tipo de materiales des-
critos aquí con anterioridad que son conocidos en la
técnica, y luego será tratada con cualquier molécula

bifuncional que también sea conocida en la técnica y sea funcionalizada de modo apropiado para reaccionar con el aditivo original, con tal que se utilice un exceso suficientemente grande de la molécula bifuncional para proporcionar grupos colgantes que sean capaces de reaccionar subsiguientemente con la enzima que se desee inmovilizar. Utilizando estos grupos colgantes funcionales como un lugar de fijación para las enzimas, esto permitirá que las enzimas tengan una mayor movilidad y permitirá por lo tanto que la actividad catalítica de la enzima permanezca en un alto nivel por un período de tiempo relativamente más largo que el que se alcanzará cuando la enzima haya sido inmovilizada por cualquiera de los otros métodos tales como oclusión en un retículo de gel, adsorción sobre una superficie sólida o reticulación de la enzima por medio de reactivos bifuncionales, etc. No obstante, no todas las formulaciones producirán resultados equivalentes en términos de estabilidad o de actividad.

Ejemplos de enzimas que pueden ser inmovilizadas por una reacción de unión covalente y que contienen un grupo amino capaz de reaccionar con un radical aldehídico o isocianato del grupo colgante que está fijado a un material polímero ocluido y ad-

sorbido dentro de los poros de un material de soporte poroso, incluirán tripsina, papaína, hexoquinasa, beta-galactosidasa, ficina, bromelaina, deshidrogenasa láctica, glucoamilasa, quimotripsina, pronasa, acilasa, invertasa, amilasa, glucosa-oxidasa, pepsina, renina, proteasa fúngica, etc. En general, puede utilizarse cualquier enzima cuyo lugar activo no está implicado en la unión covalente. Si bien la discusión antes mencionada se centraba en grupos colgantes que contenían como un radical funcional situado sobre ellos un grupo aldehídico o isocianato, también está considerado dentro del alcance de este invento que el grupo colgante puede contener otros radicales funcionales capaces de reaccionar con radicales carboxi, sulfhidrilo u otros, usualmente presentes en enzimas. No obstante, la unión covalente de enzimas que contienen estos otros radicales con otros grupos colgantes puede no realizarse necesariamente con resultados equivalentes, y puede implicar también costos apreciablemente mayores para preparar compuestos intermedios. Ha de entenderse que la enumeración antes mencionada de soportes sólidos porosos, monómeros, hidrolizados, polímeros y enzimas, es sólo representativa de las diversas clases de compuestos que pueden utilizarse, y que el presente invento no ha de estar limitado ne-

cesariamente a ellos.

La preparación de las composiciones de materia del presente invento se efectúa preferiblemente en una operación de tipo discontinuo tal como ya se ha descrito con anterioridad con detalle, si bien está considerado también dentro del alcance de este invento que la formación de la composición de materia terminada puede efectuarse también en un modo de trabajo continuo. Cuando se utiliza un trabajo de tipo continuo, una cantidad del material de soporte sólido poroso es colocada en un aparato apropiado, que usualmente constituye una columna. El material de soporte sólido poroso puede estar en cualquier forma deseada, tal como polvo, gránulos, monolitos, etc., y es cargado en la columna, después de lo cual una solución preferiblemente acuosa, por ejemplo de una amina polifuncional, es puesta en contacto con el soporte poroso hasta que este último esté saturado con la solución de amina, y el exceso es luego evacuado. Una molécula bifuncional distanciadora o intermedia, tal como glutarodialdehído, es puesta en contacto luego con el soporte saturado. Por lo tanto, la formación de la matriz polímera se efectúa en un sistema acuoso, efectuándose dicha reacción durante un período de tiempo que puede oscilar en una duración de 1 a 10 horas, pero que usualmente es

de corta duración. Después de eliminar el glutaro-
dialdehído en exceso por evacuación y separación por
lavado de cualesquiera materiales solubles en agua y
que no hayan reaccionado, lo cual en el caso de una
5 poliamina se efectúa preferiblemente con una solución
tampón que posee un pH de aproximadamente 4, una solu-
ción acuosa de la enzima es puesta en contacto o re-
circulada a través de la columna, efectuando esta ope-
ración una unión covalente de dicha enzima con los
10 grupos aldehídicos terminales de las moléculas colgan-
tes funcionalizadas que se extienden desde la matriz.
Esto ocurre hasta que ya no hay más adsorción física
y/o unión covalente de la enzima con la matriz orgá-
nica-inorgánica y moléculas colgantes. La enzima en
15 exceso es recuperada en el fluido saliente después de
evacuar y lavar la columna. Por lo tanto la columna
está dispuesta para utilizarse en reacciones químicas
en las cuales ha de tener lugar el efecto catalítico
de la enzima. Los métodos se realizan en su mayor par-
20 te dentro de los parámetros de tiempo, temperatura y
concentración aquí descritos con anterioridad en el
método de tipo discontinuo, y darán como resultado
complejos de enzimas inmovilizadas comparables. También
está considerado dentro del alcance de este invento
25 el hecho de que con modificaciones apropiadas de los

parámetros de pH y de temperatura, que resultarán evidentes para los expertos en la materia, los procedimientos pueden ser aplicados a una amplia variedad de soportes porosos inorgánicos, de reaccionantes formadores de polímeros, y de enzimas.

Los siguientes ejemplos están dados con fines de ilustración de las nuevas composiciones de materia del presente invento y de métodos para preparar las mismas. No obstante, estos ejemplos se dan meramente con fines de ilustración y ha de entenderse que el presente invento no está necesariamente limitado a ellos.

EJEMPLO I

En este ejemplo, 2 gramos de un cuerpo compuesto de sílice-alúmina poroso que contenía fosfato de boro incorporado en él, con un tamaño de partículas de mallas 40-80, un diámetro de poros que oscilaba entre aproximadamente 100 y aproximadamente 55.000 Angstroms y una superficie específica de aproximadamente 150-200 m²/g, fueron utilizados en calidad del soporte inorgánico para la nueva composición de materia del presente invento. Este soporte fue calcinado a una temperatura de aproximadamente 260°C para eliminar cualquier cantidad de humedad adsorbida conteni-

da en él. Después de ello el soporte fue tratado con 25 ml de una solución acuosa al 4% de tetraetilpen-
tamina a la temperatura ambiente durante un período
de 1 hora en vacío, para facilitar la penetración de
5 la solución dentro de los poros del soporte. Luego, la
solución no adsorbida en exceso fue decantada, habien-
do sido adsorbido aproximadamente 25% de la tetraeti-
lenpentamina dentro de los poros del soporte. Después
de esto, el soporte húmedo fue tratado con 25 ml de
10 una solución acuosa al 5% de glutarodialdehído a la
temperatura ambiente y tuvo lugar una reacción casi
inmediata con la formación de un producto de reacción
insoluble tanto sobre la superficie como dentro de
los poros del soporte. La solución de glutarodialdehi-
15 do en exceso fue luego decantada y el complejo orgáni-
co-inorgánico fue lavado para eliminar reaccionantes
no reaccionados y no adsorbidos, efectuándose dicho
lavado primero con agua seguido por lavado con una so-
lución tampón de acetato 0,02 molar que poseía un pH
20 de 4,2, efectuándose la operación de lavado a una
temperatura de 45°C. Después de ello se añadió una so-
lución de enzima que contenía aproximadamente 200 mg
de glucoamilasa por 25 ml de agua, y se la dejó reac-
cionar con el cuerpo compuesto a la temperatura ambien-
25 te durante un período de 1 hora. Al final de este pe-

río de 1 hora, la solución de glucopamilasa en ex-
ceso fue decantada y el conjugado de enzima fue la-
vado con agua para eliminar cualquier enzima no fi-
jada y/o no adsorbida. Luego la composición fue li-
xiviada durante un período de 24 horas con una solu-
ción tampón de acetato similar a la descrita aquí
con anterioridad. La cantidad de enzima adsorbida
y/o unida covalentemente fue determinada por micro-
análisis por cromatografía gaseosa Dumas tanto an-
tes como después de adición de la enzima. Luego se
determinó la actividad del conjugado de enzima me-
diante la cantidad de glucosa producida utilizando
una solución de almidón diluida al 30% en calidad
de sustrato a un pH de 4,2 y a 60°C, y empleando el
método de glucostato de Worthington para analizar
glucosa, siendo considerado este último como el méto-
do más digno de confianza para determinar la utili-
dad del producto conjugado. Se obtuvo por este méto-
do una actividad de 28 unidades por gramo de soporte
con una carga de enzima de 29 mg/g de soporte
(representando una unidad la producción de 1 gramo
de glucosa por hora a 60°C de acuerdo con las especi-
ficaciones de análisis). Se observará que a pesar
de la conocida solubilidad a pH de 4,2 del conjugado
de enzima cuando se prepara en la ausencia de un so-

5 porte inorgánico, se produjo una despreciable pérdida de enzima desde el complejo inorgánico-orgánico combinado durante la lixiviación con la solución tampón de pH 4,2. Esto fue demostrado analizando el fluido saliente de este tratamiento.

EJEMPLO II

10 En este ejemplo se siguió el método del Ejemplo I con la excepción de que el soporte poroso inorgánico tenía un tamaño de partículas de mallas 10-30. Este cuerpo compuesto de sílice-alúmina que contenía fosfato de boro incorporado en él fue tratado con tetraetilenpentamina, glutarodialdehído y glucoamilasa de una manera similar a la indicada aquí con anterioridad. Se obtuvo un complejo de enzima 15 inmovilizada, activo, aunque probablemente se produce una actividad disminuida a causa de un problema de difusión, debido al mayor tamaño de partículas del cuerpo compuesto.

EJEMPLO III

20 De una manera similar a la indicada en el Ejemplo I anterior, 2 gramos de un cuerpo compuesto de sílice-alúmina que poseía las mismas características físicas de tamaño de partículas, diámetro de po- 25

ros y superficie específica que se indican en el
Ejemplo I, fueron tratados con una solución en acetona
de tetraetilenpentamina y seguido por una solución
de toluendiisocianato también en acetona en lugar de
5 glutarodialdehído acuoso. Después de decantar la solución
de diisocianato en exceso y de lavar con agua,
el complejo orgánico-inorgánico fue tratado adicionalmente
con una solución acuosa de glucoamilasa. Igual
que en el Ejemplo I, el producto terminado comprendía un
10 complejo de enzima activo, completamente insoluble.

EJEMPLO IV

Para ilustrar el hecho de que pueden utilizarse
diversas concentraciones de soluciones para preparar
15 el producto deseado, se repitió el método indicado
en el Ejemplo I anteriormente, con la excepción de
que se utilizaron soluciones más concentradas de
los diversos reaccionantes. Por ejemplo, 2 gramos de
un cuerpo compuesto de sílice-alúmina de mallas 10-30
20 fueron tratados con 25 ml de una solución al 20% de
tetraetilenpentamina, y tras decantar se les añadieron
50 ml de una solución al 25% de glutarodialdehído. Este
complejo, después de lavar, fue tratado luego con
glucoamilasa acuosa para preparar un conjugado de
25 enzima inmovilizada que mostró una actividad de aproxi-

madamente 12 unidades por gramo, basado en el ensayo de glucostato.

EJEMPLO V

5 A un cuerpo compuesto de sílice-alúmina que comprende 2 gramos de partículas de mallas 10-30 se añadieron 25 ml de una solución acuosa al 5% de colágeno parcialmente hidrolizado, que estaba en lugar de la tetraetilenpentamina. Después de decantar y de tratar
10 con glutarodialdehído, la matriz orgánica-inorgánica fue lavada y luego tratada con una solución de glucoamilasa. La composición de materia terminada fue tratada de una manera similar a la indicada antes en el
15 Ejemplo I, por decantación, lavado y lixiviación con una solución tamponada (pH de 4,2) para proporcionar un conjugado de enzima inmovilizada que tenía una actividad de aproximadamente 10 unidades por gramo.

EJEMPLO VI

20 En este ejemplo un cuerpo compuesto de sílice-alúmina que tenía un tamaño de partículas de mallas 10-30, un diámetro de poros que oscilaba entre aproximadamente 100 y aproximadamente 55.000 Angstroms y una
25 superficie específica de desde aproximadamente 150-200 m²/g, fue tratado añadiendo tetraetilenpentamina en una

5 solución acuosa al 1% de colágeno parcialmente hidrolizada, utilizándose el colágeno como un agente de unión adicional. Después de evacuar y de hacer reaccionar con glutarodialdehído, la matriz orgánica-inorgánica fue tratada luego con una solución de glucoamilasa de acuerdo con el método general del Ejemplo I para preparar un conjugado de enzima activo.

EJEMPLO VII

10 Para ilustrar el hecho de que pueden utilizarse diversas enzimas para preparar las composiciones de materia deseadas, un cuerpo compuesto de sílice-alúmina que contenía fosfato de boro incorporado en él, fue tratado con una solución de tetraetilenpentina, fue decantado y lavado, seguido por adición de
15 una solución de glutarodialdehído, y el cuerpo compuesto resultante fue tratado luego con una solución acuosa de lactasa. Esto produjo un conjugado de enzima activo. Pueden utilizarse métodos similares para
20 fijar enzimas tales como proteasas, glucosa-isomerasa, y glucosa-oxidasa para producir conjugados activos.

EJEMPLO VIII

25 En este ejemplo, una columna que poseía un diámetro interior de 20 mm contenía 14,2 gramos de un

conjugado de enzima activo preparado a partir de glucoamilasa que fue unido a un soporte poroso de sílice-alúmina de mallas 10-30 que contenía fosfato de boro incorporado en él, habiendo sido preparado el conjugado de una manera similar a la indicada antes en el Ejemplo I. La columna fue utilizada de modo continuo durante un período de 30 días a una temperatura de 45°C para hidrolizar una solución acuosa diluida al 30% de almidón, que había sido tamponada a un pH de 4,2. El fluido saliente fue vigilado en cuanto a la producción de glucosa utilizando el método de glucoestado de Worthington. Se encontró que no había pérdida aparente de actividad de enzima durante este período de tiempo y que el porcentaje de conversión de almidón en glucosa a esta temperatura y en un caudal de aproximadamente 150 ml por hora, era de 62%.

EJEMPLO IX

Con el fin de ilustrar el hecho de que pueden utilizarse diversos sustratos o soportes para preparar las composiciones de materia deseadas, un monolito recubierto con alúmina que consistía en un cuerpo cerámico alveolar con canales de gran tamaño conectadores fue tratado de una manera similar a la

indicada en el Ejemplo I anterior, es decir el monolito fue tratado con soluciones de tetraetilenpentina, glutarodialdehído y una enzima de glucoamilasa, llevándose a cabo el tratamiento en una operación sucesiva que incluía los procedimientos de decantación, lavado y lixiviación anteriormente descritos. El monolito cerámico original poseía un peso en seco de 256 gramos, de los cuales un 13% consistía en un recubrimiento de alúmina. El conjugado de enzima inmovilizada, terminado, fue incorporado dentro de una columna dentro de un tubo de vidrio que tenía un diámetro interior de 70 mm con el fin de que pudiera ser hecho trabajar continuamente mediante un aparato de bombeo apropiado, dentro de un recipiente de temperatura controlada, siendo mantenido dicho recipiente a una temperatura de 45°C. Durante un período de 40 días de utilización continua para la hidrólisis de una solución de almidón diluida tamponada al 30%, se encontró que sólo se había perdido aproximadamente 3% de la actividad original del conjugado de enzima mientras se mantenía un caudal de aproximadamente 85 ml por hora. Además, se encontró que durante el período de 40 días hubo una conversión de aproximadamente 80% del almidón en glucosa. Con el fin de estudiar aún más las propiedades del sistema, se efectuaron variaciones subsiguientes en el caudal,

5 durante lo cual se encontró que con un caudal de aproximadamente 38 ml por hora era posible obtener una conversión dentro del margen de desde 92-93% de almidón en glucosa. El período de tiempo relativamente largo, durante el que se utilizó esta enzima para convertir almidón en glucosa sin ninguna pérdida significativa de actividad de enzima bien sea por desorción bien sea por inactivación, indicó un largo tiempo de semivida del catalizador.

10

EJEMPLO X

15 En este ejemplo se preparó un tipo de conjugado de monólito y una columna similar a como se describe en el Ejemplo IX, con la excepción de que la enzima que se utilizó para preparar el complejo comprendía lactasa en lugar de glucoamilasa. El conjugado fue ensayado en cuanto a estabilidad bajo una circulación continua al tiempo que se mantenía la temperatura a 37°C, durante un período de 29 días. Se encontró de nuevo que no había pérdida aparente de actividad del conjugado de enzima inmovilizado. Esta enzima inmovilizada fue utilizada en el tratamiento de una solución de lactosa 20 al 5% que había sido tamponada a un pH de 4,2, siendo cargada dicha solución de lactosa en la columna con un caudal de 54 ml por hora. Se encontró durante el pe-

25

ríodo de 29 días que había una conversión aproximada-
mente de 35% de lactosa en glucosa y galactosa.

5

- REIVINDICACIONES -

10

15

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

20

25

1a.- Un método para preparar un conjugado de enzima inmovilizada que comprende una matriz orgánica-inorgánica combinada que consiste en un soporte poroso inorgánico que contiene un material polímero orgánico adsorbido y ocluído en los poros del mismo, conteniendo dicho material polímero grupos colgantes funcionalizados, y una enzima adsorbida junto a dicha matriz y unida covalentemente con los radicales funcionales de dichos grupos colgantes de dicho

5-5-77

- 39 -

material polímero orgánico en o adyacentemente a las por-
ciones terminales del mismo, el cual método comprende tra-
tar dicho material de soporte inorgánico con una primera
solución de un monómero bifuncional o polifuncional, de
5 un hidrolizado polímero o de un polímero previamente for-
mado; eliminar la solución no adsorbida; poner en contac-
to dicho material de soporte inorgánico con un exceso re-
lativamente grande de una segunda solución monómera bifun-
cional para formar dicha matriz orgánica-inorgánica; aña-
10 dir una solución de enzima a la matriz orgánica-inorgáni-
ca resultante; y eliminar los materiales no reaccionados.

2ª.- El método de la reivindicación 1ª, en
que dicha primera solución, dicha segunda solución, y di-
cha solución de enzima son todas ellas soluciones acuo-
15 sas.

3ª.- El método de la reivindicación 1ª, en
que como soporte o vehículo para dicho monómero bifuncio-
nal o polifuncional, dicho hidrolizado polímero o dicho
polímero previamente formado se utilizan disolventes or-
20 gánicos baratos tales como acetona y tetrahidrofurano.

4ª.- El método de una cualquiera de las rei-
vindicaciones 1ª a 3ª, en que dicho segundo monómero bi-
funcional tiene grupos reactivos que están separados por
una cadena que contiene de 4 a 10 átomos de carbono.

25 5ª.- Un método para preparar un conjugado

de enzima inmovilizada.

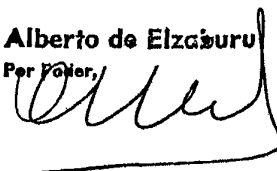
Tal y como se ha descrito en la Memoria
que antecede y para los fines que se han especificado.

5 Esta Memoria consta de cuarenta y una ho-
jas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 07. VII. 1977

P.A. Alberto de Elzaburu

Per Foter,



5-5-77
VGD.

- 41 -