



ESPAÑA

10 ES	11 NUMERO	10 A 1
	451.047	
	22 FECHA DE PRESENTACION	
	27-8-76	

PATENTE DE INVENCION

20 PRIORIDADES:	22 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
75.26530	28 agosto 1.975	FRANCIA
76.22985	28 julio 1.976	FRANCIA

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	B01J 1/04, C07G 7/02	

64 TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO DE SEPARACION DE PROTEINAS

71 SOLICITANTE (S)
RHONE-POULENC INDUSTRIES., entidad francesa

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
22, Avenue Montaigne, 75 PARIS (8ème), Francia.

72 INVENTOR (ES)
François MEILLER., Ing., Bernard MIRABEL, Ing.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
GOMEZ-ACEBO

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de separación de las proteínas por intercambio de iones.

5. Se conoce el separar las proteínas por intercambio de iones aplicando celulosa o dextrano, sobre los que se fijan sea aminas terciarias o amonio cuaternario o bien sea funciones ácidas. No obstante, estos trocadores de iones carecen de propiedades mecánicas, y por consiguiente, no pueden ser utilizados en columna, su volumen sufre modificaciones con la fuerza iónica y el pH del medio de utilización. Además, son biodegradables y no pueden ser esterilizados. Las resinas trocadoras de iones aplicadas en el procedimiento de la invención no presentan estos inconvenientes, disponen de buenas propiedades mecánicas, no son sensibles a la fuerza iónica ni al pH del medio de utilización, no son biodegradables y se pueden esterilizar. También permiten obtener proteínas muy puras.

10. El procedimiento de separación de las proteínas, según la invención, consiste en poner en contacto una solución de proteínas con una resina trocadora de iones y se caracteriza en que el trocador está constituido por un soporte mineral poroso que tiene una granulometría comprendida entre 4  $\mu$ m y 5 mm, una superficie específica del orden de 5 a 150 m<sup>2</sup>/g, un diámetro de poros de 500 a 2500 Å, un volumen poroso de 0,4 a 2 ml/g, revestido de una cantidad inferior de 15 mg/m<sup>2</sup> de una película de polímero reticulado que contiene o que lleva sea grupos trocadores de aniones representados por aminas terciarias o sales de amonio cuaternario, o bien sea grupos trocadores de cationes representados por funciones ácidas, y posee una capacidad de intercambio inferior a 2 meq./g.

25. Como soporte mineral poroso, se aplican unos óxidos metálicos tales como: óxido de titanio, alúminas y más particu-

30.

5. larmente sílices: estos soportes poseen diámetros porosos medios de 500 a 2500 Å y de preferencia de 600 a 1500 Å una superficie específica de 5 a 150 m<sup>2</sup>/g y de preferencia de 20 a 50 m<sup>2</sup>/g y una granulometría de 4 μm a 5 mm, según la aplicación de que se trata. Así, se utilizan las partículas más finas en las aplicaciones analíticas y las más gruesas en las aplicaciones preparatorias.

10. Los grupos funcionales, aminas terciarias o sales de amonio cuaternario, son representados por las fórmulas generales  $-\text{CH}_2-\underset{\text{R}}{\text{N}}-\text{CH}_2-$  o  $-\text{CH}_2-\overset{\text{R}}{\text{N}}^{(+)}-(\text{R})_3\text{X}^{(-)}$ , en las que R idéntico o

15. diferente representa un grupo alquilo o hidroxialquilo que posee de 1 a 4 átomos de carbono y X un anión mineral u orgánico, tal como por ejemplo, cloruro, sulfato, nitrato, fosfato, citrato.

Los grupos funcionales ácidos, carboxílicos sulfónico o fosfónico, corresponden a las fórmulas generales  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$   $-\text{PO}(\text{OH})_2$ .

20. Estos grupos funcionales forman parte de la cadena del polímero reticulado, o son fijados al polímero reticulado que cubre toda la superficie del soporte.

25. Los polímeros reticulados que cubren la superficie del soporte mineral son productos conocidos en si mismos, obtenidos según todo procedimiento clásico de polimerización. Se preparan a partir de monómeros susceptibles de reticular sea solos, o bien sea con otro monómero, en presencia eventualmente un catalizador. Entre estos monómeros podemos citar: los compuestos epoxídicos que reticulan con las poliaminas como catalizadores; los monómeros que reticular por policondensación sin catalizador con el formaldehído tales como la urea,

30.

- la melamina, las poliaminas, los fenoles; los monómeros vinílicos como por ejemplo la vinilpiridina, el estireno y sus derivados, los ácidos acrílicos, metacrílico, vinilbenzoico que reticulan con monómeros polifuncionales como el diacrilato o dimetacrilato de mono- o polialquileno-glicol, el divinilbenzeno, el viniltrialcoxisilano, el viniltrihalogenosilano, la bis metileno acrilamida, en presencia de un iniciador que libera los radicales libres como los peróxidos orgánicos y los azonitrilos o en presencia de rayos ultra-violeta.
- 5.
10. Para obtener el revestimiento del soporte mineral por el polímero reticulado, se impregna el soporte de una solución del o de los monómeros y eventualmente del catalizador en un disolvente, lo cual permite una buena repartición de los monómeros sobre toda la superficie del soporte mineral,
15. se evapora a continuación el disolvente y los monómeros reticulados según los procedimientos conocidos. Como disolvente se aplica todo producto disolvente de los monómeros y del catalizador, cuyo punto de ebullición es de preferencia, lo más bajo posible para favorecer su evaporación ulterior.
20. Son por ejemplo, el cloruro de metileno, el éter etílico, el benceno, la acetona, el acetato de etilo.
25. Un procedimiento particularmente adaptado a la preparación de un trocador catiónico, por revestimiento de soportes por compuestos epoxídicos ha sido descrito en la solicitud de patente francesa nº 74.29702 depositada el 30 de Agosto de 1974 y titulada "SUPPORTS MINERAUX MODIFIES",

("Soportes minerales modificados").

5. En el caso en que el polímero reticulado en la superficie del soporte mineral no posea en su cadena grupos funcionales, según se define más arriba, es necesario modificarlo; es el caso particularmente de los polímeros reticulados a base de estireno y derivados, de los polímeros del formaldehído con la urea, la melamina, las poliaminas, los fenoles.

10. Esta modificación, en el caso de polímeros del estireno o fenol formaldehído consiste en fijar sobre el polímero bien sea grupos carboxílico, sulfónico, fosfónico, según cualquier procedimiento conocido, bien grupos clorometilo, que se hacen después reaccionar con una amina secundaria o terciaria, reacción efectuada según cualquier técnica conocida.

15. Para fijar los grupos clorometilo sobre el polímero conviene, en el caso de los polímeros del estireno, dispersar el soporte mineral revestido del polímero en éter clorometílico en caliente, en presencia de un ácido de Lewis. Sin embargo, en el caso de una resina fenol-formaldehído, se puede  
20. por ejemplo, dispersar el soporte mineral revestido del polímero en epíclorhidrina y hacer reaccionar en caliente.

25. Esta modificación en el caso de polímeros del formaldehído con las poliaminas, la urea, la melamina consiste en transformar las aminas primarias presentes en la cadena en aminas terciarias o sales de amonio cuaternario según toda técnica clásica, por ejemplo reacción con un sulfato o un halógeno de alquilo.

30. En la operación de revestimiento del soporte mineral, la cantidad de monómero (s) a aplicar debe ser tal que la cantidad de polímero reticulado que posee grupos funcionales,

repartidos a la superficie del soporte mineral sea inferior a 15 y de preferencia comprendida entre 1 y 8 mg/m<sup>2</sup>.

5. Los soportes minerales revestidos de polímeros reticulados que poseen grupos funcionales, así obtenidos, tienen una capacidad de intercambio inferior a 2 meq./g y de preferencia comprendida entre 0,3 y 1,2 meq./g.

El procedimiento de la invención se aplica a todas las proteínas solubles en medio acuoso, cualquiera que sea su punto iso-eléctrico.

10. Entre estas proteínas, en las que se encuentran los polipéptidos y las enzimas, podemos citar, entre otros: la albúmina, las lactalbúminas, la ovalbúmina, la serumalbúmina, la hemoglobina, las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -globulinas, las lactoglobulinas, el fibrinógeno, la ureasa, la tripsina, la lisozima, la pepsina, las proteasas y citocromo.

15. El procedimiento según la invención, permite separar muy fácilmente las proteínas de sus soluciones, tales como lactosuero, cerveza, sangre, extractos de órganos y de cualquier efluente industrial; aguas residuales de matadero, de industrias alimentarias, de féculas, constituyendo así un medio de depuración de dichos efluentes, y por lo tanto un medio de lucha contra la polución.

20. La separación se obtiene poniendo en contacto, a una temperatura, una fuerza iónica y un pH compatibles con la o las proteínas la solución a tratar con la resina trocadora de iones elegida en función de las condiciones de separación. Tiene entonces lugar la fijación, sobre la resina trocadora de iones, bien sea de la proteína que se busca o bien sea de la o de las otras proteínas contenidas en la solución, o también de la totalidad de las proteínas de la so-

25.

30.

lución.

5. Se puede igualmente obtener la separación, en las mismas condiciones, mediante puesta en contacto de la solución que va a tratarse con sucesivamente una o varias resinas trocadoras de aniones y/o cationes. Hay entonces una fijación selectiva de las proteínas de la solución sobre cada resina.

10. En el caso de que la proteína buscada se fije sobre una resina, a partir de una solución protéica o no, se separa a continuación por elución con una solución que tiene un pH y/o una fuerza iónica diferentes de los de la solución de fijación, pero sin embargo compatibles con la proteína. Se obtiene así, no solamente la separación de la proteína respecto la solución, sino igualmente su purificación y su concentración. Así, se puede por ejemplo separar y concentrar la albúmina, la pepsina, las proteínas del lactosuero con una resina catiónica y la lisozima con una resina aniónica.

15. En el caso de que la proteína que se pretenda puede en la solución protéica tratada según la invención y que las demás proteínas de la mezcla estén fijas, se obtiene la separación de la proteína buscada respecto a las otras proteínas, y por tanto su purificación. La elución de las proteínas fijadas conduce a una separación selectiva o no de dichas proteínas y a su concentración. Este es el caso, entre otros de la  $\gamma$ -globulina con una resina catiónica.

20. En el caso de que se fijen varias proteínas pretendidas simultáneamente sobre una resina, la elución de pH y/o fuerza iónica diferentes de los de la solución de fijación dará una separación de las proteínas de la solución y su concentración. La elución por soluciones de pH y/o fuerza iónica crecientes dá, además de la separación selectiva, la purifica-

25.

30.

ción y la concentración. Este es el caso, particularmente, del suero humano.

En el caso de que se trate de eliminar las proteínas, éstas se fijarán sobre una resina a partir de su solución.

5. Se obtienen así soluciones desproteïnadas, es decir, purificadas. La elución de las proteínas fijadas permite la reutilización de la resina. Este es el caso más particularmente de la clarificación de la cerveza y del tratamiento de las soluciones contentivas de hemoglobina con resinas aniónicas.

10. La separación se puede efectuar con resultados idénticos en discontinuo o en continuo.

En las operaciones en continuo, las resinas permiten un fácil llenado de la columna, una gran producción y una facilidad de elución.

15. Los resultados obtenidos son prácticamente independientes de la concentración de la solución tratada, pero son función de la naturaleza del grupo trocador de la resina, del pH, de la fuerza iónica y del volumen de producción tanto de las soluciones a tratar como de la solución de elución.

20. El procedimiento según la invención es aplicable en las industrias alimentarias, en particular dietética, farmacéutica y veterinaria.

Damos a continuación, a título indicativo y no limitativo, ejemplos de realización del invento.

25. EJEMPLO 1:

Preparación de la resina trocadora.

Se toman 100 gr de sílice de una granulometría de 100 a 200  $\mu\text{m}$ , una superficie específica de 24  $\text{m}^2/\text{gr}$ , un diámetro poroso medio de 1.400  $\text{\AA}$  y un volumen poroso de 1  $\text{ml}/\text{gr}$

30. y se secan a 150°C bajo presión reducida, durante 5 horas.

La sílice seca obtenida se introduce en una solución de 250 ml de cloruro de metileno, 60 ml de estireno destilado, 20 ml de viniltrietoxisilano y 0,5 gr de azobis-isobutironitrilo.

5. Se evapora el cloruro de metileno a la temperatura ambiente, y después la sílice impregnada se calienta a 120°C durante 6 horas, bajo 3 bares, para obtener la reticulación.

10. Se pone entonces la sílice en suspensión en 300 ml de xileno y se calienta hasta ebullición durante 2 horas. Después de filtrar, se lava la sílice con acetona, y después se seca.

El análisis dá una proporción de carbono de 4 % en peso con relación a la sílice revestida.

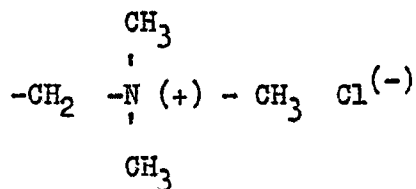
15. Se ponen 50 gr de la sílice obtenida en suspensión en 180 gr de éter clorometílico, contentivo de 6 gr de cloruro estánico, y se calienta después la mezcla hasta reflujo durante 4 horas, en un medio anhidro.

20. Tras enfriamiento, se orea la sílice, se lava con 200 ml de una mezcla dioxano-agua 50-50 que contiene 10 ml de ácido clorhídrico, y después con agua hasta la neutralidad, secándose finalmente.

La proporción de carbono es entonces de 4,1 % y la de cloro de 1,90 %.

25. Se pone en suspensión el producto obtenido, en 150 ml de una solución acuosa al 30 % de trimetilamina y se deja en contacto 8 días a la temperatura ambiente.

Tras orear y lavar, se obtiene una resina trocadora de iones que lleva grupos funcionales.



5. que posee las características siguientes:

- grado de carbono: 4,8 %

- grado de cloro: 2 %

- grado de nitrógeno: 0,9 %

- cantidad de polímero fijado: 3,3 mg/m<sup>2</sup>

10. - capacidad de intercambio: 0,5 meq./gr.

Tratamiento de una solución de albúmina.

Se colocan 10 gr de la resina trocadora obtenida, en una columna de 1 cm de diámetro y se mantienen comprimidos, equilibrándose después la resina a un pH 6,5 con un tampón de fosfato 0,01 M.

15. Se percola una solución de albúmina de 1 % en peso en el mismo tampón, a razón de 180 ml/h, hasta una saturación de la columna, lo que corresponde a aproximadamente 200 ml de solución. Se lava a continuación la resina con 100 ml del mismo tampón.

20. Se eluye entonces la albúmina fijada por percolación de una solución de NaCl M en el mismo tampón, cuya producción es de 180 ml/h. 45 ml de solución permiten recuperar la albúmina en solución a 3,3 % en peso.

25. Se deriva de ello que el trocador tiene una capacidad en albúmina de 150 ml/gr y que habrá permitido concentrar la solución de albúmina.

30. Se repite 30 veces, la misma operación, sin que se observe ningún aumento de volumen ni envejecimiento del trocador.

Ejemplo 2

Se repite el ejemplo 1 con una solución de albúmina a 0,2 % en peso en lugar de 1 %.

5. Se obtienen los mismos resultados, es decir, que se obtiene la misma concentración en albúmina, cualquiera que sea la concentración de la solución tratada.

Ejemplo 3

10. Se repite el ejemplo 1, pero se efectúa la elución de la proteína con un tampón citrato 0,05 M, pH 6,5. Se obtienen 59 ml de solución de albúmina a 2,5 % en peso.

Este ensayo muestra la influencia de la naturaleza del tampón de elución sobre la concentración de la solución obtenida.

Ejemplo 4

15. Se efectúa el tratamiento de una solución de albúmina de la misma manera que en el ejemplo 1, pero utilizando 41 gr de la resina trocadora en una columna de 1 cm de diámetro y una producción de elución de 80 ml/h en lugar de 180 ml/h.

20. La concentración de la solución de albúmina obtenida es del 7 % en peso. Lo que muestra que aumentando la altura útil de la columna y disminuyendo la velocidad de elución, se aumenta la concentración de la solución obtenida.

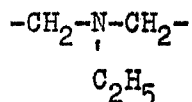
Ejemplo 5

Preparación de la resina.

25. En 150 ml de cloruro de metileno contentivo en solución de 6,5 gr de N,N-bis (epoxi-2,3 propil) etilamina y 3 gr de trietilenotetramina, se introducen 50 gr de una sílice de una granulometría de 40-100/um, una superficie específica de 37 m<sup>2</sup>/gr, un diámetro de poros de 1100 Å y un volumen poroso de 1,05 ml/gr.
- 30.

Se evapora entonces el cloruro de metileno a temperatura ambiente; se calienta la sílice impregnada a 60°C durante 60 horas para obtener la reticulación, se lava con agua hirviente, y después con acetona.

5. La resina trocadora obtenida está formada de sílice revestida con un polímero reticulado que contiene grupos funcionales:



10. y posee las características siguientes:

- grado de carbono	8,8 %
- grado de nitrógeno	2,4 %
- cantidad de polímero fijado	3,3 mg/m <sup>2</sup>
- capacidad de intercambio	1 meq./gr.

15. Separación de  $\gamma$ -globulina

Se sitúa 10 gr de la resina trocadora obtenida, en una columna de 1 cm de diámetro y se mantienen comprimidos. Se equilibra la resina en ácido clorhídrico 0,1 N, y después en tampón fosfato 0,02 M, pH 6,5.

20. Se percolan 20 ml de una solución de suero humano delipidado y liofilizado a 1 % en peso en el mismo tampón fosfato, a razón de 100 ml/h. Se lava a continuación la resina con 50 ml del mismo tampón fosfato.

25. La solución que sale de la columna contiene en estado electroforéticamente puro la  $\gamma$ -globulina presente en la solución inicial.

30. Las otras proteínas:  $\alpha$ -globulinas,  $\beta$ -globulinas y albúmina, igualmente presentes en la solución inicial, quedan fijadas sobre la resina. Se recuperan por elución con una solución de NaCl 3 M en el mismo tampón de fosfato.

Si se efectúa la elución mediante tampones de fuerza iónica creciente, aumentando la concentración en NaCl, se obtienen soluciones enriquecidas en  $\alpha$ -globulinas,  $\beta$ -globulinas y albúmina.

5. Ejemplo 6

Preparación de la resina.

Se opera como en el ejemplo 5, pero con una sílice que tiene una granulometría de 100 a 200  $\mu$ m y con 6,5 gr de N,N-bis(epoxi-2,3 propil) butilamina en lugar de 6,5 gr de N,N-bis (epoxi-2,3 propil) etilamina.

La resina trocadora obtenida está constituida por sílice revestida con un polímero reticulado que contiene grupos funcionales:



y posee las características siguientes:

- grado de carbono	9,2 %
- grado de nitrógeno	2,5 %
- cantidad de polímero fijado	3,2 mg/m <sup>2</sup>
20. - capacidad de intercambio	1,1 meq./gr.

Extracción de proteínas.

Se colocan 10 gr de la resina trocadora obtenida, en una columna de 1 cm de diámetro y se mantienen comprimidos. Se equilibra la resina sucesivamente en ácido clorhídrico a 0,1 N, y después en tampón de fosfato 0,01 M, pH 7,5.

25. Se percolan, a razón de 80 ml/h, 30 ml de una solución a 1 % en peso en el mismo tampón fosfato de polvo de lactosuero ultrafiltrado, contentivo de 75 % en peso de proteínas. Se lava a continuación la resina con 100 ml del mismo tampón fosfato.

30.

Las soluciones que salen de la columna contienen las materias grasas y la lactosa presentes en la solución inicial.

5. Las proteínas, lactalbúminas, lactoglobulinas, sueroalbúmina y una pequeña parte de las inmunoglobulinas, presentes en la solución inicial quedan fijadas sobre la resina. Por elución con un tampón Mac Ilvaine 0,05 M, pH 4, se recuperan las proteínas separadas y purificadas.

Ejemplo 7

10. Extracción de proteínas.

Se colocan 20 gr de una resina trocadora semejante a la del ejemplo 1, pero cuya granulometría es de 200-500  $\mu$ m, en una columna de 2,5 cm de diámetro y se mantienen comprimidos.

15. Se equilibra sucesivamente la resina en ácido clorhídrico 0,1 N, y después en tampón tris HCl 0,01 M, pH 7.

20. Se percolan, a razón de 300 ml/h, 600 ml de una solución formada por 300 ml del mismo tampón tris-HCl y 300 ml de lactosuero delipidado a 0,5 % en peso de proteínas solubles. Se lava a continuación la resina con 100 ml del mismo tampón.

Las soluciones que salen de la columna contienen la lactosa presente en la solución inicial.

25. Las proteínas: lactalbúminas, lactoglobulinas, sueroalbúminas, y una pequeña parte de las inmunoglobulinas, presentes en la solución inicial, quedan fijadas sobre la resina. Son eluidas por paso por la columna de un tampón citrato-sosa 0,1 M, pH 7. La solución obtenida contiene la totalidad de las proteínas fijadas, en una concentración de 4 % en peso.

30. La operación ha permitido obtener una mezcla de

proteínas puras, exentas de lactosa, en solución mucho más concentrada que la inicial.

Después de 30 operaciones sucesivas, no se observa ningún envejecimiento de la resina.

5. Ejemplo 8

Tratamiento de una solución de pepsina

Se colocan 3 gr de una resina trocadora semejante a la del ejemplo 1, en una columna de 1 cm de diámetro.

10. Se lava la resina con 100 ml de agua destilada, se cuellan después 150 ml de una solución de pepsina en bruto, 20 unidades de pepsina por ml a razón de 100 ml/h. A continuación se lava la resina con 20 ml de agua destilada.

15. La solución que sale de la columna y el agua de lavado no presentan ninguna actividad; toda la pepsina queda fija sobre la resina. Las impurezas han quedado en la solución, como lo muestran las medidas de extracto seco.

La pepsina fijada se eluye entonces por percolación de una solución de NaCl M a razón de 100 ml/h.

20. 16 ml de solución permiten recuperar la pepsina en solución a 170 unidades de pepsina/ml.

Se comprueba la concentración importante de la solución obtenida.

La resina se vuelve a utilizar después de lavado con 50 ml de agua destilada.

25. Después de 10 operaciones sucesivas, no se observa ningún envejecimiento de la resina.

Ejemplo 9

Preparación de la resina trocadora.

30. Se toman 100 gr de sílice de una granulometría de 100 a 200  $\mu$ m, una superficie específica de 25 m<sup>2</sup>/gr, un diáme-

tro poroso medio de 1400 Å y un volumen poroso de 1,1 ml/gr, y se impregnan con una solución de 200 ml de cloruro de metileno, 24 gr de ácido acrílico, 6 gr de dimetacrilato de dietileno glicol y 0,4 gr de peróxido de benzoilo.

5. Se evapora el cloruro de metileno a temperatura ambiente y presión atmosférica hasta un peso constante; después, se calienta la sílice impregnada a 80°C, durante 6 horas, para obtener la polimerización.

10. Se pone entonces la sílice en suspensión en 300 ml de agua y se calienta hasta la ebullición durante 6 horas. Después de filtrar, se lava la sílice con acetona, y se seca después al vacío a 80°C.

15. Se obtiene una resina trocadora de iones que posee grupos funcionales - COOH, que posee las siguientes características:

- grado de carbono	10,55 %
- cantidad de polímero fijado	7,2 mg/m <sup>2</sup>
- capacidad de intercambio	1,05 meq./gr

Tratamiento de una solución de lisozima.

20. Se sitúan 10 gr de la resina trocadora obtenida, en una columna de 1 cm de diámetro y se mantienen comprimidos, poniéndose después la resina bajo forma NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por percolación de 2 litros de una solución acuosa de acetato amónico 0,5 N tamponada a un pH de 8,2.

25. Se equilibra a continuación la resina a pH 6,5 con 100 ml de tampón tris-ácido maléico 0,02 M.

30. Se percola una solución de lisozima a 1 % en peso en el mismo tampón, a razón de 180 ml/h, hasta saturación de la columna, lo que corresponde a aproximadamente 200 ml de solución. Se lava a continuación la resina con 100 ml de tam-

pón tris-ácido maléico 0,02 M, pH 8,2.

La lisozima fijada se eluye entonces por percolación de una solución de NaCl M en el mismo tampón, cuya producción es de 180 ml/h. 50 ml de solución permiten recuperar la lisozima en solución a 2,5 % en peso.

5.

Se deriva de ello que el trocador tiene una capacidad en lisozima de 125 mg/gr y que ha permitido concentrar la solución de lisozima.

#### Ejemplo 10

10.

#### Preparación de la resina trocadora.

Se toman 100 gr de sílice de una granulometría de 100 a 200/um, una superficie específica de 37 m<sup>2</sup>/gr, un diámetro poroso medio de 1200 Å y un volumen poroso de 0,95 ml/gr y se impregnan con una solución de 150 ml de cloruro de metileno, 60 ml de estireno destilado, 20 ml de viniltrietoxisilano y 0,5 gr de azobisisobutironitrilo.

15.

Se evapora el cloruro de metileno a la temperatura ambiente y a la presión atmosférica hasta un peso constante, y después la sílice impregnada se calienta a 120°C, durante 6 horas, para obtenerse la reticulación.

20.

Se pone entonces la sílice en suspensión en 300 ml de xileno y se calienta hasta ebullición durante 6 horas. Después de orear, se lava la sílice con acetona, y se seca después a 80°C.

25.

Se ponen 50 gr de la sílice modificada obtenida en suspensión en 500 ml de cloroformo y 50 gr de HSO<sub>3</sub>Cl en solución en 50 ml de cloroformo son añadidos gota a gota. Se desprende ácido clorhídrico. Después de la introducción, se calienta la mezcla agitada a 50°C, durante 4 horas.

30.

Tras orear, y después de lavar con agua hasta la

neutralidad, y después con acetona y secado al vacío a 80°C, se obtiene una resina trocadora de iones con grupos funcionales  $-SO_3H$ , que presenta las características siguientes:

- |    |                               |                       |
|----|-------------------------------|-----------------------|
|    | - grado de carbono            | 4 %                   |
| 5. | - grado de azufre             | 1,4 %                 |
|    | - cantidad de polímero fijado | 2,8 mg/m <sup>2</sup> |
|    | - capacidad de intercambio    | 0,43 meq./gr          |

#### Extracción de hemoglobina

10. Se colocan 10 gr de la resina trocadora obtenida, en una columna de 1 cm de diámetro, y se equilibra después la resina a un pH de 6,5 con un tampón de fosfato 0,02 M.

15. Se percolan 500 ml de una solución de hemoglobina a 0,2 % en peso en el mismo tampón, a razón de 100 ml/h. La hemoglobina es absorbida en el trocador. La solución efluente incolora no contiene ya hemoglobina y, así, queda purificada.

La hemoglobina absorbida es eluida por percolación de una solución de carbonato amónico 0,5 M, y se lava después la columna sucesivamente con 300 ml de sosa 0,1 N y con 50 ml de HCl 1N, antes de la reutilización.

20.

#### Ejemplo 11

##### Tratamiento de lactosuero

Se colocan 20 gr de una resina trocadora semejante a la del ejemplo 1, en una columna de 2,5 cm de diámetro (columna nº 1).

25.

Se colocan 10 gr de una resina trocadora semejante a la del ejemplo 9, en una columna de 2,5 cm de diámetro (columna nº 2).

Se ponen en serie las dos columnas y se lavan las resinas con 500 ml de agua.

30.

Se filtran 500 ml de lactosuero ajustado a un pH de

7,5 por adición de sosa 0,1 N, para eliminar los insolubles, y se filtran después en la columna nº 1 y en la columna nº 2 a razón de 300 ml/h.

5. La prueba de precipitación de las proteínas por el ácido tricloroacético muestra que el lactosuero que sale de la columna nº 2 no contiene ya proteína.

Se lavan las resinas de las dos columnas mediante paso de 100 ml de agua.

10. Las proteínas: lactalbúminas, lactoglobulinas, suero-albúmina y una parte muy pequeña de las inmunoglobulinas, presentes en la solución inicial, se fijan sobre la resina de la columna nº 1. Son eluidas, tal como se ha descrito en el ejemplo 7.

15. Las proteínas fijadas sobre la resina de la columna nº 2 son esencialmente las inmunoglobulinas no fijadas sobre la resina de la columna nº 1. Se eluyen por percolación de una solución de carbonato amónico M. La solución obtenida contiene las inmunoglobulinas representan aproximadamente un 16 % en peso de la totalidad de las proteínas de la solución inicial.

20. Se lavan a continuación las columnas mediante paso de 500 ml de agua antes de la reutilización.

Después de 10 operaciones sucesivas, no se comprueba ningún envejecimiento de las resinas.

#### Ejemplo 12

25. Extracción de las proteínas de la cerveza.

Se colocan 60 gr de una resina trocadora semejante a la del ejemplo 9, en una columna de 2,5 cm de diámetro, y se lavan después con 250 ml de agua.

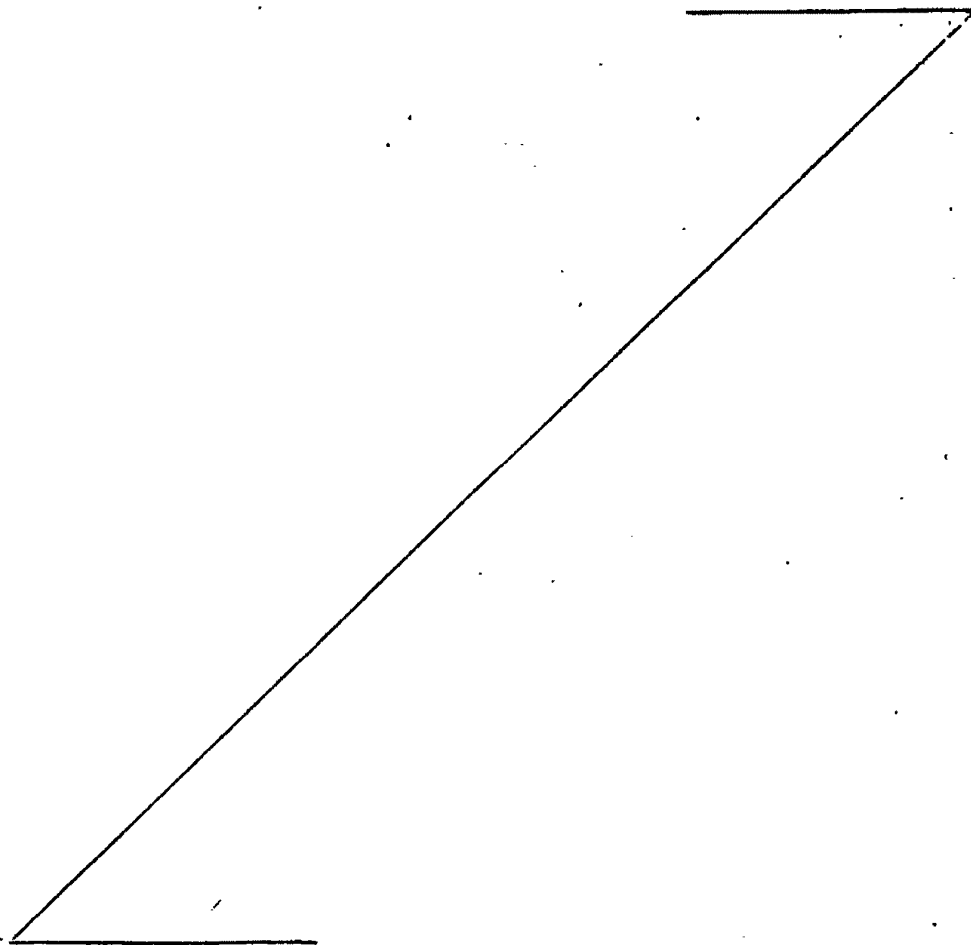
30. Se percolan 3 litros de cerveza no clarificada, a razón de 100 ml/h. La cerveza que sale de la columna no preci-

pita ya por adición de ácido pícrico y presenta las características de una cerveza clarificada.

5 Los productos fijados sobre la resina son esencialmente proteínas. Se eluyen por percolación de 400 ml de ácido clorhídrico N/10.

Se lava la resina por paso de 250 ml de agua antes de la reutilización.

10 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.



REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de separación de proteínas, caracterizado porque comprende las operaciones siguientes:

a) Puesta en contacto a una temperatura, bajo una fuerza ionizante y un pH compatibles con la o las proteínas, de una solución de proteínas con una resina intercambiadora de iones, constituida por un soporte mineral poroso que tiene una granulometría comprendida entre 4  $\mu$ m y 5 mm, una superficie específica del orden de 5 a 150 m<sup>2</sup>/gr, un diámetro de poro comprendido entre 500 y 2.500 Å, un volumen poroso de 0,4 a 2 ml/g revestido con una cantidad inferior a 15 mg/m<sup>2</sup> de una película de polímero reticulado que contiene o es portador, bien de grupos intercambiadores de aniones, representados por aminas terciarias o sales de amonio cuaternario, bien agrupamientos intercambiadores de cationes representados por funciones ácidas, y que posee una capacidad de intercambio inferior a 2 meq/g;

b) fijación sobre la resina intercambiadora de iones de una o varias proteínas;

c) elución de la o de las proteínas fijadas con una solución que tenga un pH y/o una fuerza iónica diferentes a las de la solución a tratar.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el soporte mineral es un óxido metálico; óxido de titanio, alúminas, sílices.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los grupos trocadores de aniones están representados por las fórmulas  $-\text{CH}_2-\overset{\text{R}}{\underset{|}{\text{N}}}-\text{CH}_2-$  ó  $-\text{CH}_2-\overset{\text{R}}{\underset{|}{\text{N}}}^{\text{(+)}}(\text{R})_3 \text{X}^{\text{(-)}}$

R

con R idéntica o diferente representativa de un grupo alquilo

o hidroxialquilo de 1 a 4 átomos de carbono y representando X un anión mineral u orgánico.

5 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los grupos trocadores de cationes son funciones ácidas carboxílica, sulfónica o fosfónica.

10 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el polímero reticulado es resultante de la polimerización de compuestos epoxídicos en presencia de poliamidas; de mezclas de formaldehído con urea, melamina, poliaminas, fenoles; de mezclas de monómeros vinílicos; vinilpiridina, estireno y derivados, ácidos acrílico, metacrílico, vinilbenzoico con monómeros polifuncionales: diacrilato o dimetacrilato de mono- o polialquileno-glicol, divinilbenceno, viniltrialcoxisilano, viniltrihalogenosilano, bis metileno acrilamida.

15 6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las proteínas, comprendidas las polipeptidas y las enzimas están representadas por la albúmina, las lactalbuminas, la ovalbúmina, la suero-albúmina, la hemoglobina, las  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -globulinas, las lactoglobulinas, el fibrinógeno, la ureasa, la tripsina, la lisozima, la pepsina, las proteasas, el citocromo.

20

25 7.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las soluciones de proteínas a tratar están representadas por lactosuero, la cerveza, la sangre, los extractos de órganos y toda clase de efluentes industriales.

8.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque una o varias de las proteínas que se pretende encontrar quedan fijadas sobre la resina trocadora, y después se eluyen.

9.- Procedimiento según la reivindicación 1, caract-

terizado porque la proteína buscada queda en la solución y las otras proteínas de la solución quedan fijadas sobre la resina trocadora.

5

10.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque todas las proteínas se fijan y la solución se purifica.

10

11.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la solución de proteína se pone en contacto con sucesivamente una o varias resinas intercambiadoras de aniones y/o de cationes.

12.- Procedimiento de separación de proteínas, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 23 hojas escritas a máquina por una sola cara.

- 1 FEB. 1974

Madrid,

RHONE-POULENC INDUSTRIES

J. M. GOMEZ ASECA Y PEREZ

p. p. Firmado: J. Suarez Diaz



*[Handwritten mark]*