



(19)

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

(11) N.º de publicación: ES 2 038 563

(21) Número de solicitud: 9002666

(51) Int. Cl.⁵: B01J 19/26

(12)

PATENTE DE INVENCION

A6

(22) Fecha de presentación: **23.10.90**

(73) Titular/es:
**Universitat de Valencia (Estudi General)
C/ Nave, 2
45002 Valencia, ES**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **16.07.93**

(72) Inventor/es:
**Guardia Cirugeda, Miguel Antonio;
Morales Rubio, Angel Enrique y
Daros Arnau, José Antonio**

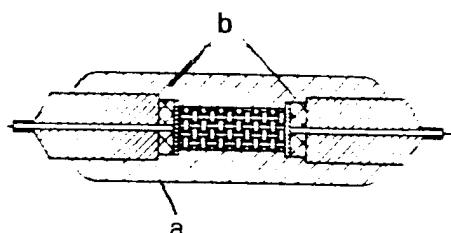
(45) Fecha de publicación del folleto de patente:
16.07.93

(74) Agente: **No consta.**

(54) Título: **Reactor para el empleo de enzimas inmovilizadas en reacción de flujo continuo (FIA) en medios orgánicos no acuosos.**

(57) Resumen:

Reactor para el empleo de enzimas inmovilizadas en reacciones en flujo continuo (FIA) en medios orgánicos no acuosos que consiste en un tubo rígido de un material inerte con sendas piezas perforadas en sus extremos que, presionando sobre dos filtros (b) (que pueden ser de material poroso de teflón) cierran el interior del todo (a). Dicho reactor tiene la ventaja de ser reutilizable e inatacable por los ácidos y los disolventes orgánicos, pudiéndose guardar a baja temperatura. El reactor se puede incorporar fácilmente en un montaje FIA convencional y su empleo en medios orgánicos no requiere la inmovilización covalente de las enzimas.



DESCRIPCION

Título

Reactor para el empleo de enzimas inmovilizadas en reacciones en flujo continuo (FIA) en medios orgánicos no acuosos.

Campo de la técnica

Analítica y biotecnología.

Introducción

Las enzimas son catalizadores biológicos que cuentan entre sus características la de un enorme especificidad. Este principio se ha venido aprovechando para dotar de selectividad a determinados métodos de análisis.

Estado de la técnica

Tradicionalmente se han desarrollado métodos en disolución acuosa con objeto de mantener las enzimas en un medio lo más parecido posible al celular. Sin embargo, el desarrollo en los últimos años de la enzimología en medios orgánicos abre una nueva vía de investigaciones en los análisis enzimáticos (Rafi Z. Kazandjian, Jonathan S. Dordick and Alexander M. Klibanov. "Enzymatic Analyses in Organic Solvents", Biotechnology and Bioengineering, 28, 417 (1986)).

Por otra parte, el desarrollo de las técnicas de flujo continuo (Ruzicka J. and E.H. Hansen. *Flow Injection Analysis*, Wiley, New York (1988); Valcarcel M. y Luque de Castro M. D., Análisis por Inyección en Flujo., Dpto. de Química Analítica, Universidad de Córdoba (1984)) ha permitido la automatización de muchos métodos de análisis y presenta ventajas considerables en las determinaciones enzimáticas, habiéndose desarrollado numerosos métodos de análisis enzimáticos en medio acuoso empleando enzimas inmovilizadas sobre diferentes tipos de soporte (Mark A. Arnold and Mark E. Meyerhoff. "Recent Advances in the Development and Analytical Applications of bio-sensing Probes". CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry, 20, issue 3 (1988)).

En la bibliografía se han propuesto distintos tipos de reactores para su empleo con enzimas inmovilizadas que son en general de muy escaso volumen, no permiten su reutilización y el empleo en disoluciones acuosas dificulta su conservación, a la vez que obliga a un proceso laborioso de inmovilización covalente de las enzimas para evitar el arrastre.

Descripción de la invención

El empleo de enzimas en medios orgánicos permite el análisis de sustancias solubles en disolventes orgánicos. Además, en un medio orgánico la estabilidad de las enzimas es mucho mayor que en disolución acuosa y la mayor parte de los mecanismos de degradación que son de tipo hidrolítico se encuentran inhibidos. Por otra parte la existencia de un medio inerte permite prescindir de la adición de agentes bacteriostáticos.

El empleo de reactores enzimáticos en medio orgánico para la realización de análisis en flujo continuo se beneficia de la posibilidad de anclar las enzimas sobre un soporte de vidrio poroso sin necesidad de recurrir a mecanismos de unión covalente, a causa de la habitual insolubilidad de las enzimas en los disolventes orgánicos. Además de las ventajas de ahorro de reactivos y facilidad de reutilización que ofrecen, los reactores

enzimáticos añaden la posibilidad de su conservación a baja temperatura durante períodos prolongados de tiempo.

El reactor objeto de la presente invención (figura 1) se basa en los principios expuestos y consiste, básicamente, en un tubo rígido de un material inerte tal como el teflón (1), con sendas piezas perforadas en sus extremos (2) que, presionando sobre dos filtros (3) cierran el interior del tubo (4) que actuará como reactor.

Los filtros (3) serán de un material apropiado para el objeto al que se destinan como puede ser un filtro poroso de teflón tal como se indica en el ejemplo de aplicación.

El reactor propiamente dicho (4) se rellena con un paquete de vidrio poroso de características adecuadas para soportar la enzima a utilizar la cual se deposita siguiendo las técnicas habituales. Ejemplo

Se ha diseñado el reactor enzimático que se indica en la figura 2. El reactor consta básicamente de un tubo rígido de teflón que se cierra en sus extremos con dos piezas atornilladas (a) y que incluyen dos discos (b) que permiten acoplar membranas filtrantes de nylon (c) a la entrada y salida. Mediante una contratuerca (d) se asegura el cierre.

El diseño tubular del reactor y su cierre mediante tornillos y con discos de ajuste permite modificar el volumen de relleno; por lo que un mismo reactor puede ser utilizado para distintos rellenos diferente cantidad de enzima y diferente cantidad de sustrato.

Por otra parte los discos de cierre aseguran la retención del relleno mediante filtros adecuados para cada tipo de aplicación. Los reactores están construidos íntegramente en teflón, que es inerte frente a los disolventes orgánicos.

Para la conservación de los reactores se pueden reemplazar los tornillos de ajuste por tapones roscados que permiten conservar las enzimas en el medio orgánico en que se vayan a utilizar y en ausencia de aire y agua.

Los resultados con los reactores de peroxidasa han demostrado la estabilidad y reproducibilidad del sistema, pudiéndose, en principio, utilizar estos reactores con cualquier tipo de enzima.

El reactor se ha utilizado en un sistema de flujo continuo (FIA) para analizar peróxido de hidrógeno en medio no acuoso, como se indica a continuación:

El reactor se preparó empaquetando 216 mg de vidrio poroso de tamaño de poro controlado (Sigma, PG-2000-200), con tamaño de malla de 120 a 200 μm sobre los que se precipitaron por evaporación 2,4 mg de peroxidasa de rábano (*Armoracia rusticana*) (E.C. 1.11.1.7) disueltos en tampón fosfato potásico 0,1 M y pH 7.

Como disolución portadora se utilizó p-anisidina 1 mM disuelta en una mezcla de acetato de etilo-tolueno 1:1 (v/v) saturada con tampón fosfato potásico 0,1 M y pH 7. Como patrones se utilizaron concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno disuelto en un medio igual a la disolución portadora.

El sistema de medida empleado se muestra en la figura 3 y consta de:

- (a) recipiente para la disolución portadora.
- (b) bomba peristáltica con tubo resistente a la acción de los disolventes orgánicos empleados (Bev-A-Line V HT, Thermoplastic Processes, Inc., N.J., USA).
- (c) válvula de inyección.
- (d) reactor objeto de la patente, equipado con filtros de nylon de $100 \mu\text{m}$ de poro.
- (e) cubeta de flujo con paso óptico de 1 cm.

Las medidas se llevaron a cabo registrando la absorbancia a 458 nm en función del tiempo con espectrofotómetro del tipo diodo de barrido (Diode array 8452 A, Hewlet Packard).

Utilizando unas condiciones de trabajo optimizadas de $500 \mu\text{l}$ de volumen de inyección y un caudal de $4\text{ml}/\text{min}$ se obtiene el diagrama que se presenta en la figura 4 y que consta de 5 inyecciones de diez patrones: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y $20 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ en peróxido de hidrógeno.

En la figura 5 se representa la recta de cali-

brado obtenida para estos patrones: $A = 2229 (\text{H}_2\text{O}_2) + 0.02$, con un coeficiente de correlación lineal de 0.999, este resultado supone un límite de detección de $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ en la determinación de peróxido de hidrógeno. La reproducibilidad de las lecturas corresponde a un coeficiente de variación menor del 1%. El grado de conversión del peróxido de hidrógeno por el reactor, en las condiciones del calibrado es del 97%.

Aplicaciones

La aplicación de los reactores objeto de la presente invención pueden extenderse también al análisis de muestras insolubles en disolventes orgánicos empleando micelas reversas para el transporte de las muestras e inmovilizando las enzimas covalentemente.

Los reactores se pueden emplear para el análisis en disolución acuosa inmovilizando los enzimas covalentemente con las mismas ventajas de cualquier reactor de los propuestos en la bibliografía, pero con las limitaciones, respecto al empleo de los disolventes orgánicos, de una menor estabilidad.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Reactor para el empleo de enzimas inmovilizadas en reacciones en flujo continuo (FIA) en medios orgánicos no acuosos consistente, básicamente, en un tubo rígido de un material inerte (ver figura 1.1), con sendas perforadas en sus extremos (figura 1.2) que, presionando sobre dos filtros (figura 1.3), cierran el interior del tubo (figura 1.4) que actuará como reactor.

2. Reactor para el empleo de enzimas inmovilizadas en reacciones en flujo continuo (FIA) en medios orgánicos no acuosos, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los filtros (ver figura 2) son de un material apropiado para el objeto al que se destinan como puede ser un filtro poroso de teflón.

5

3. Reactor para el empleo de enzimas inmovilizadas en reacciones en flujo continuo (FIA) en medios orgánicos no acuosos, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque el reactor propiamente dicho se rellena con un paquete de vidrio poroso de características adecuadas para soportar la enzima a utilizar, la cual se deposita siguiendo las técnicas habituales.

10

4. Reactor para el empleo de enzimas inmovilizadas en reacciones en flujo continuo (FIA) en medios orgánicos no acuosos, según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque mediante el empleo de enzimas inmovilizadas para el tratamiento en línea de muestras en medios orgánicos se evita el empleo de técnicas de inmovilización covalente de las enzimas sobre el soporte, al no existir arrastre de las enzimas por el portador.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

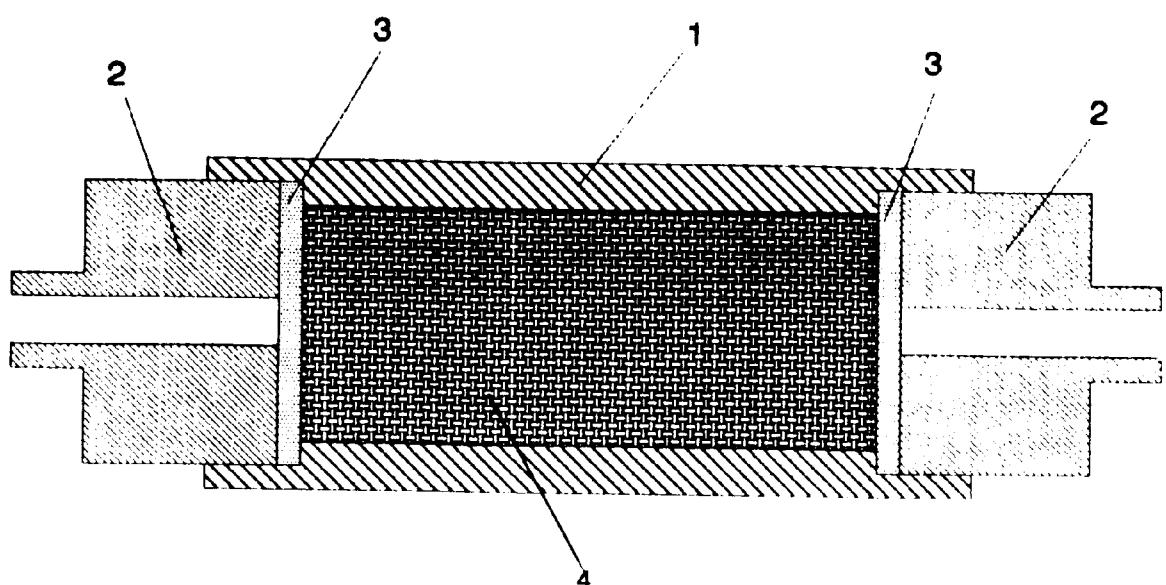


figura 1

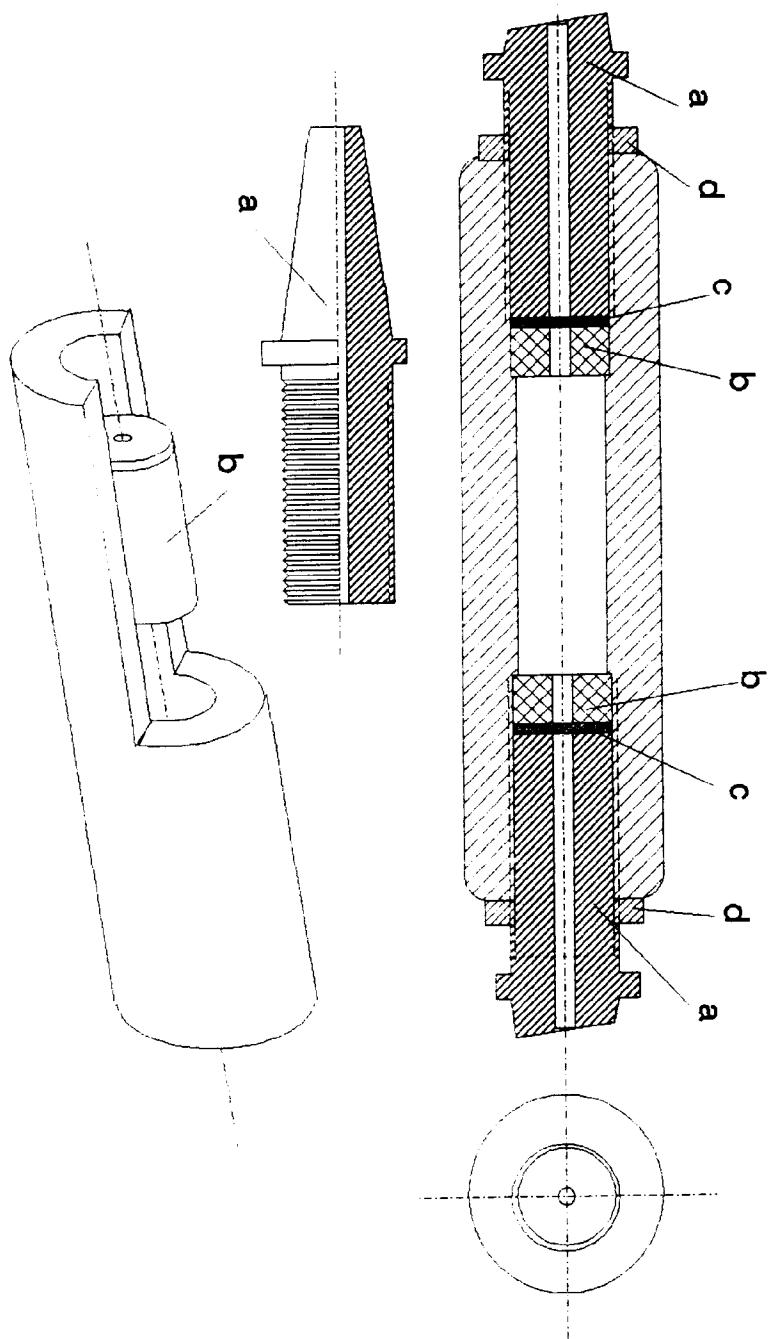


FIGURA 2

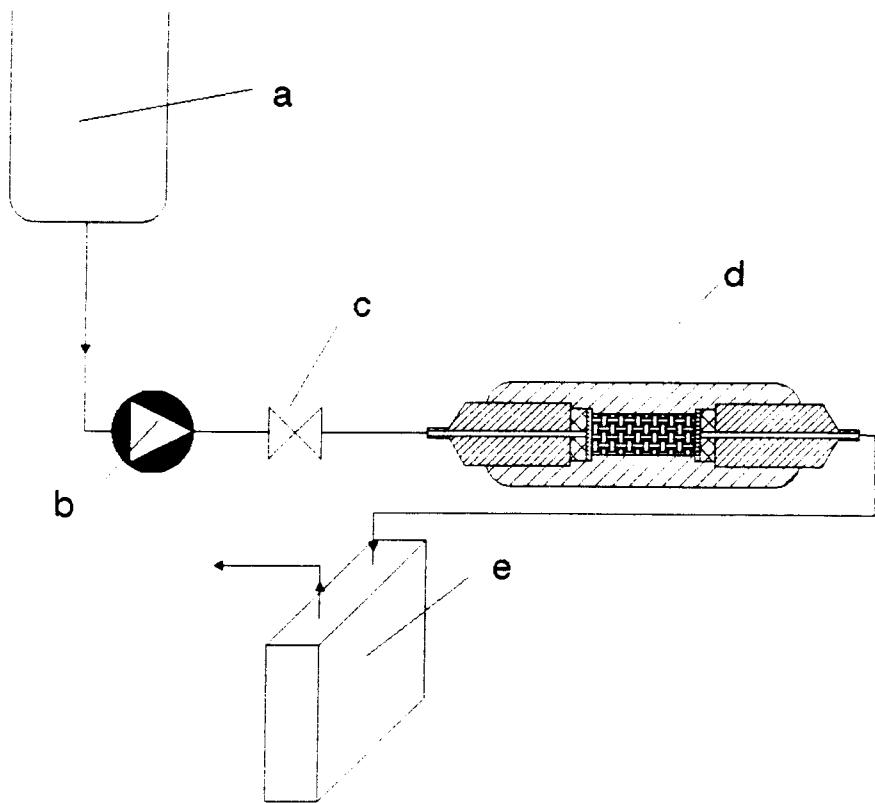


FIGURA 3

2 038 563

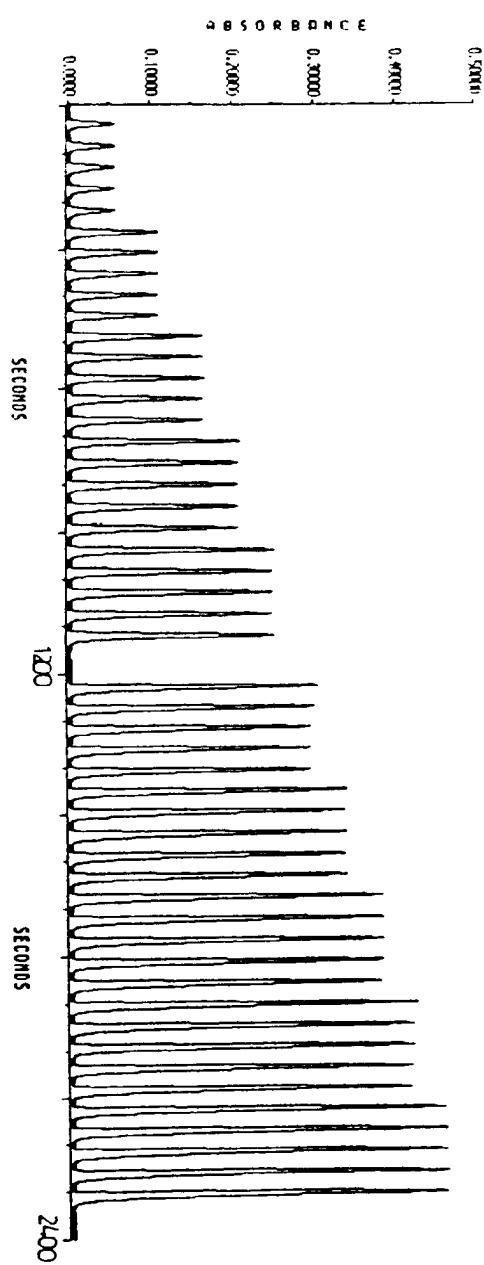


FIGURA 4

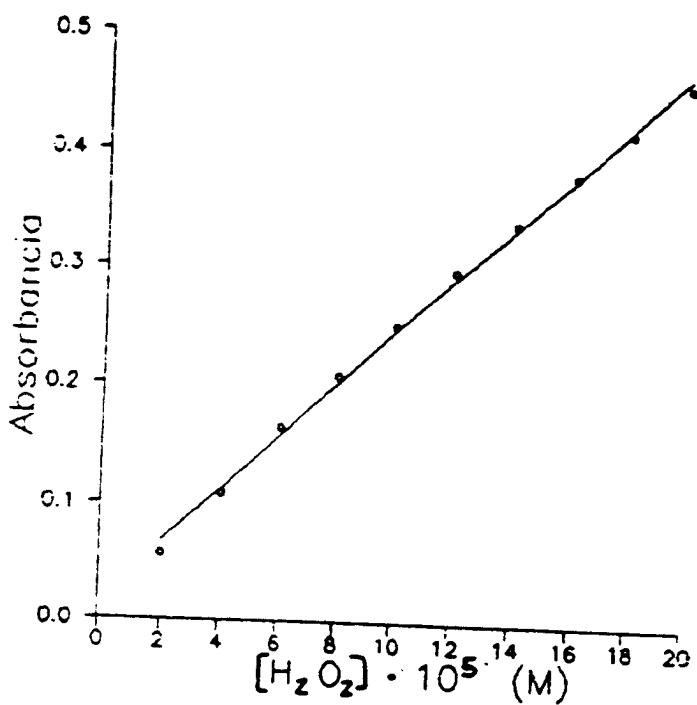


figura 5