

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 250**

51 Int. Cl.:  
**C08F 6/00** (2006.01)  
**C08F 6/10** (2006.01)  
**C12N 9/80** (2006.01)  
**C08F 20/54** (2006.01)  
**C08F 26/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06763798 .3**  
96 Fecha de presentación: **20.06.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1904535**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

54 Título: **DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE FORMAMIDA RESIDUAL EN POLÍMEROS.**

30 Prioridad:  
**21.06.2005 DE 102005029014**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.03.2012**

73 Titular/es:  
**BASF SE**  
**67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es:  
**HÄRING, Dietmar;**  
**ANGEL, Maximilian;**  
**HÄHNLE, Hans-Joachim;**  
**FRIEDRICH, Thomas;**  
**HAUER, Bernhard;**  
**BRAIG, Volker;**  
**CHRISSTOFFELS, Lysander y**  
**RÜBENACKER, Martin**

74 Agente/Representante:  
**Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 376 250 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCION

Degradación enzimática de formamida residual en polímeros

La presente invención se refiere a un procedimiento para la reducción de formamida en preparados polímeros, que están constituidos por monómeros de N-vinilformamida.

### 5 Estado de la técnica

Disoluciones de polímeros y copolímeros de vinilformamida pueden contener formamida como impureza debido a su obtención. Las concentraciones de formamida se pueden situar típicamente en el intervalo de 500 a 20 000 ppm. Para una serie de campos de aplicación, a modo de ejemplo cosmética, es deseable reducir el contenido en formamida. Según campo de aplicación es deseable una reducción a valores de menos de 500 ppm a menos de 10

10 ppm. Simultáneamente es esencial que el método aplicado no modifique la estructura de polímero, en especial no se generarán grupos amino debido a la hidrólisis de las cadenas laterales de formamida.

Los intentos de reducir el contenido en formamida de disoluciones de polímero mediante métodos de desodorización físicos, como destilación, arrastre de vapor o arrastre de gas, no se han mostrado apropiados.

15 En la WO 00/09573 se describe la hidrólisis de formamida para dar formiato y amoníaco mediante tratamiento del polímero con ácido o base. No obstante, este tipo de procedimiento no conduce a resultados satisfactorios, ya que la hidrólisis es insignificante, o bien las unidades formamida del polímero se saponifican igualmente en una fracción significativa.

Los intentos de eliminar la formamida mediante oxidación o reducción tampoco dieron buen resultado, al igual que los intentos de transformar químicamente la misma con una serie de reactivos.

20 En todos estos casos no se consiguió una conversión de formamida, o se establecieron reacciones secundarias indeseables en el polímero, como por ejemplo descenso del peso molecular, reticulación o hidrólisis.

Son conocidas diferentes enzimas que pueden hidrolizar formamida:

25 ureasa de habas gigantes ("Jack bean urease") [EC 3.5.1.54] cataliza con actividad elevada la hidrólisis de urea, y con actividad claramente más reducida la hidrólisis de formamida para dar ácido fórmico y amoníaco (Dixon et al., Can. J. Biochem. 1980, 581335-1344; Fishbein, Biochem. Biophys. Acta 1997, 484, 433-442; Blakeley y Zerner, J. Mol. Cat. 1984, 23, 263-292).

Greenwood et al (FEMS Microbiol. Lett. 1998, 160, 131-135) describen una ureasa de *Methylophilus methylotrophus* [EC 3.5.1.54], que puede hidrolizar formamida en disolución acuosa.

30 Clarke (Adv. Microbial Physiol. 1970, 4, 179-222) investigó la especificidad de sustrato de amidasas alifáticas de *Pseudomonas aeruginosa*. En este caso se investigaron en un ensayo de actividad diversas amidas alifáticas, como por ejemplo formamida, acetamida.

Wyborn et al. (Eur. J. Biochem. 1996, 240, 314-322; Microbiology 1994, 140, 191-195) investigaron una formamidasa de *Methylophilus methylotrophus*. En la purificación del enzima y en la expresión heteróloga se llevó a cabo un ensayo de actividad para la hidrólisis de formamida.

35 Cornelius et al. (J. General Microbiol., 1981, 125, 367-374) describen dos amidasas de *Alcaligenes eutrophus*. La especificidad de sustrato respecto a formamida y otras amidas alifáticas se investigó en un ensayo de actividad.

Planteamiento del problema

Era tarea de la invención la reducción del contenido en formamida en preparados polímeros acuosos bajo condiciones suaves, de modo que no se ataque en este caso la estructura del polímero.

### 40 Descripción de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para la reducción del contenido en formamida de preparados (Z), que se obtienen a partir de monómeros de N-vinilformamida mediante polimerización, poniéndose en contacto una hidrolasa de la clasificación de enzimas E.C.3.5.1.5 con (Z), reduciéndose el contenido en formamida a menos de 50 ppm.

Entre las ureasas es especialmente apropiada la ureasa de habas gigantes (ing, jack beans), así como una ureasa de *Lactobacillus*, en especial *Lactobacillus*.

Una formamidasas especialmente apropiada es la formamidasas de *Methylophilus methylotrophus*, descrita inicialmente por Wyborn et al.

- 5 Los enzimas se pueden emplear purificados en diversos grados de pureza en el procedimiento según la invención, o bien se pueden emplear también como extracto relativamente impurificado, a modo de ejemplo como harina de habas (jack bean meal; adquirible comercialmente). El enzima se emplea preferentemente como producto sólido.

Los enzimas se pueden emplear en forma pura o como mezclas ("cocktail") de varios enzimas diferentes.

- 10 Según puesta en práctica del procedimiento, el enzima se puede poner en contacto con (Z) en forma disuelta, o bien el enzima se aplica sobre un soporte habitual, y se pone en contacto con (Z) en forma inmovilizada.

- 15 La cantidad de hidrolasa empleada en el procedimiento según la invención depende del grado de pureza de la preparación enzimática. Cantidades de enzima típicas para el procedimiento según la invención son 10 a 10000 unidades, preferentemente 100 a 1000 unidades por g de producto sólido polímero. Se denomina 1 unidad aquella cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu\text{mol}$  de urea por minuto a  $\text{pH} = 7,5$  y  $25^\circ\text{C}$ . Estas cantidades de enzima son solo valores indicativos aproximados, de los que se puede diferir también en sentido descendente y ascendente, en especial si se varían las condiciones de reacción, como temperatura y tiempo de incubación. La cantidad de hidrolasa óptima para una determinada reacción según la invención se puede determinar fácilmente mediante ensayos en serie rutinarios.

- 20 El procedimiento según la invención es aplicable a todos los polímeros que contienen N-vinilformamida incorporada por polimerización. En este caso entran en consideración tanto homo-, como también copolímeros de N-vinilformamida, así como copolímeros de injerto de las mismas. Como posibles comonómeros para N-vinilformamida son apropiadas, a modo de ejemplo, otras amidas de ácido N-vinilcarboxílico, como N-vinil-N-metilformamida, N-vinilacetamida, N-vinil-N-metilacetamida, N-vinil-N-etilformamida, N-vinil-N-n-propilformamida, N-vinil-N-isopropilformamida, N-vinil-N-isobutilformamida, N-vinil-N-metilpropionamida, N-vinil-N-butilacetamida y N-vinil-N-metilpropionamida.
- 25

- 30 Como comonómeros para N-vinilformamida entran en consideración además ácidos carboxílicos con insaturación monoetilénica con 3 a 8 átomos de carbono, así como las sales hidrosolubles de estos monómeros. A este grupo pertenecen, por ejemplo, ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido dimetilacrílico, ácido etacrílico, ácido maleico, ácido citracónico, ácido metilenmalónico, ácido alilacético, ácido vinilacético, ácido crotónico, ácido fumárico, ácido mesacónico y ácido itacónico. De este grupo de monómeros se emplea preferentemente ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido maleico, o también mezclas de los citados ácidos carboxílicos, en especial mezclas de ácido acrílico y ácido metacrílico. Los ácidos carboxílicos insaturados se pueden polimerizar tanto en forma libre, como también parcial o completamente neutralizados con bases, por ejemplo con hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido de calcio o amoniaco.

- 35 Otros comonómeros apropiados son, a modo de ejemplo, ésteres, amidas y nitrilos de los ácidos carboxílicos indicados. Los acrilatos y metacrilatos se derivan preferentemente de alcoholes saturados, monovalentes, con 1 a 4 átomos de carbono, o bien alcoholes saturados divalentes, que contienen 2 a 4 átomos de carbono.

- 40 Son ejemplos de éstos ésteres acrilato de metilo, metacrilato de metilo, acrilato de etilo, metacrilato de etilo, acrilato de n-propilo, metacrilato de n-propilo, acrilato de isopropilo, metacrilato de isopropilo, y los ésteres de ácido acrílico y ácido metacrílico, que se derivan de butanoles isómeros, así como acrilato de hidroxietilo, metacrilato de hidroxietilo, acrilato de hidroxipropilo, metacrilato de hidroxipropilo, acrilato de hidroxibutilo, acrilato de hidroxiisobutilo y metacrilato de hidroxiisobutilo.

- 45 También se deben citar acrilamida, metacrilamida, N,N-dimetilacrilamida, N-terc-butilacrilamida, acrilonitrilo, metacrilonitrilo, acrilato de dimetilaminoetilo, metacrilato de dimetilaminoetilo, acrilato de dietilaminoetilo, metacrilato de dietilaminoetilo, así como las sales de los monómeros citados en último lugar con ácidos carboxílicos o ácidos minerales, así como los productos cuaternizados.

- 50 Además se pueden emplear como comonómeros para la copolimerización de N-vinilformamida ésteres vinílicos, como formiato de vinilo, acetato de vinilo y propionato de vinilo. Además son apropiados N-vinilpirrolidona, N-vinilcaprolactama, 1-vinilimidazol, 2-metil-1-vinilimidazol y 4-metil-1-vinilimidazol, ácido vinilsulfónico, ácido alilsulfónico, ácido metililsulfónico, ácido estireno sulfónico, ácido vinilfosfónico, ácido alilfosfónico y cloruro de dialildimetilamonio. Naturalmente, también es posible emplear mezclas de los citados monómeros.

Los citados comonómeros se pueden presentar en los copolímeros que contienen N-vinilformamida, a modo de ejemplo, en forma incorporada por polimerización en un 1 a un 99 % en moles.

Además, los homo- y copolímeros de N-vinilformamida pueden estar modificados en el sentido de efectuar la polimerización en presencia de compuestos, que presentan al menos dos dobles enlaces etilénicos no conjugados en la molécula. El empleo concomitante de estos monómeros en la polimerización ocasiona un aumento del peso molecular del polímero.

A modo de ejemplo, son especialmente apropiadas alquilenbisacrilamidas, como metilénbisacrilamida y N,N'-acriloletilendiamina, N,N'-diviniletilenurea, N,N'-divinilpropilenurea, etiliden-bis-3-(N-vinilpirrolidona), N,N'-divinildimidazolil-(2,2')-butano y 1,1'-bis(3,3'-vinilbencimidazolil-2-on)-1,4-butano. Otros reticulantes apropiados son, a modo de ejemplo, di(met)acrilatos de alquilenglicol, como diacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de etilenglicol, diacrilato de tetraetilenglicol, dimetacrilato de tetraetilenglicol, acrilato de dietilenglicol, metacrilato de dietilenglicol, compuestos divinílicos aromáticos, como divinilbenceno y diviniltolueno, así como acrilato de vinilo, acrilato de alilo, metacrilato de alilo, divinildioxano, trialiléter de pentaeritrita, así como mezclas de reticulantes. Los reticulantes se aplican en cantidades de un 0,1 a un 10, preferentemente un 1 a un 4 % en peso, referido a los monómeros empleados en la polimerización.

El injerto de N-vinilformamida sobre otros polímeros ofrece otra posibilidad de modificación. Para la obtención de tales polímeros de injerto se polimeriza N-vinilformamida, en caso dado junto con otros comonómeros, citados anteriormente, en presencia de la base de injerto, del modo descrito anteriormente.

La US-A-5334287 describe, a modo de ejemplo, el injerto de N-vinilformamida sobre sustancias naturales a base de sacáridos. En este caso son apropiados como bases de injerto mono- y oligosacáridos, como glucosa, fructosa, galactosa, ribosa, manosa, sacarosa, lactosa y refinosa, o polisacáridos, como pectina, algina, quitina, quitosano, heparina, agar, goma arábiga, harina de algarrobas, goma de guar, xantano, dextrano y similares, así como pentosanos, como xilano y arabano. También entran en consideración almidones nativos del grupo almidón de maíz, almidón de patata, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de tapioca, almidón de sagú, almidón de sorgo, almidón de manioca, almidón de guisante o aquellos almidones que tienen un contenido en amilopectina de al menos un 80 % en peso, como almidón de maíz glutinoso o almidón de patata glutinoso, almidones degradados por vía enzimática o hidrolítica, como por ejemplo dextrina blanca y amarilla, así como maltodextrina, o también almidones oxidados, como por ejemplo almidón dialdehídico.

Finalmente, en esta serie se deben citar aún sacáridos modificados químicamente, como por ejemplo carboximetilcelulosa.

Por lo demás, como base de injerto son apropiados polímeros que contienen unidades óxido de alquileo, en especial homo- y copolímeros de óxidos de alquileo con 2 a 4 átomos de carbono, que son accesibles mediante polimerización de óxido de etileno, óxido de propileno, óxido de n-butileno, óxido de isobutileno o tetrahidrofurano. Tales óxidos de polialquileo se describen en la DE-A-19515943. En el caso de estos polímeros se puede tratar también de productos de adición de óxidos de alquileo con 2 a 4 átomos de carbono en alcoholes predominantemente de cadena larga, fenoles, ácidos carboxílicos y aminas. Por la DE-A-19526626 son conocidos los correspondientes polímeros de injerto sobre polímeros que contienen unidades de ésteres vinílicos de ácidos carboxílicos saturados con 1 a 4 átomos de carbono, como formiato de vinilo, acetato de vinilo, propionato de vinilo y n-butirato de vinilo, y/o unidades alcohol vinílico.

La obtención de los polímeros que contienen unidades N-vinilformamida se efectúa según los procedimientos conocidos de polimerización en disolución, precipitación, suspensión o emulsión bajo empleo de compuestos que forman radicales bajo las condiciones de polimerización. Las temperaturas de polimerización se sitúan habitualmente en el intervalo, por ejemplo, de 30 a 200, preferentemente 40 a 110°C. Son iniciadores apropiados, a modo de ejemplo, azo- y peroxicompuestos, así como los habituales sistemas iniciadores redox, como combinaciones de peróxido de hidrógeno e hidrazina. En caso dado, estos sistemas pueden contener adicionalmente cantidades reducidas de una sal de metal pesado. Como iniciador de polimerización se emplean preferentemente compuestos azoicos hidrosolubles, como 2,2'-azobis(2-metil-propionamidin)-dihidrocloruro, 2,2'-azo-bis-(4-metoxi-2,4-dimetilvaleronitrilo) y 2,2'-azo-bis-(2-metil-N-fenil-propionamidin)-dihidrocloruro. Para obtener polímeros con valor de K reducido, la polimerización se lleva a cabo convenientemente en presencia de reguladores, como por ejemplo mercaptocompuestos, compuestos alílicos, aldehídos o hidrazina.

Los polímeros obtenibles de este modo tienen valores de K de 10 a 300, preferentemente 30 a 250. Los valores de K se determinan según H. Fikentscher, Cellulose-Chemie, tomo 13, 58 a 64, y 71 a 74 (1932), en disolución acuosa de sal común al 5 %, a valor de pH 7, una temperatura de 25°C, y una concentración de polímero de un 0,1 % en peso.

En el caso de los polímeros obtenidos de este modo, la concentración de formamida se sitúa en el intervalo de 10 - 100 000 ppm. Son valores típicos 5000-10000 ppm. El procedimiento según la invención permite ahora una clara reducción de este contenido en formamida.

5 La temperatura de reacción a la que la hidrolasa se pone en contacto con (Z) se puede seleccionar en amplios intervalos, de aproximadamente 5°C a 100°C. Preferentemente se selecciona una temperatura a la que la hidrolasa empleada posee una alta actividad catalítica, lo que es el caso habitualmente entre 10 y 40°C, preferentemente entre 20 y 35°C. No obstante, si se emplean hidrolasas de microorganismos termófilos, o especialmente enzimas seleccionados respecto a resistencia a la temperatura, la temperatura de reacción puede ser claramente superior.

10 El intervalo de pH para el procedimiento según la invención se sitúa habitualmente entre 3 y 10, preferentemente entre 4 y 8. El intervalo óptimo se ajusta a la estabilidad de pH de la hidrolasa empleada.

El tiempo de reacción depende en gran medida de la cantidad de enzima seleccionada, la temperatura y la concentración del polímero en (Z), así como del "contenido en formamida residual" deseado. El tiempo de reacción se sitúa habitualmente en el intervalo de algunas horas a algunos días, preferentemente entre 5 y 24 horas.

15 En el procedimiento según la invención, el preparado polímero se presenta habitualmente en un dispersante o disolvente acuoso, preferentemente en un disolvente tamponado. (Z) se puede presentar dispersado, o preferentemente en disolución molecular. La cantidad de polímero en el preparado (Z) se puede ajustar en amplios intervalos de aproximadamente un 1 a un 99 % en peso, preferentemente de un 5 a un 50 % en peso, de modo especialmente preferente de un 10 a un 30 % en peso de polímero.

20 El procedimiento según la invención se puede llevar a cabo discontinua o continuamente. En el caso de un régimen discontinuo (por cargas), el enzima se puede añadir directamente tras la polimerización, o también tras aislamiento, y en caso dado purificación del polímero. Una vez efectuada la degradación de formamida mediante la hidrolasa, según fin de empleo se puede separar el enzima del medio de reacción. No obstante, también se puede dejar el enzima en el medio de reacción, y desactivar el mismo sólo en caso deseado, a modo de ejemplo mediante calentamiento, o mediante acidificación del medio.

25 En un control de procedimiento continuo, en una forma preferente de ejecución de la invención se emplea un enzima soportado que se pone en contacto con el preparado polímero (Z). A modo de ejemplo se puede empaquetar la hidrolasa soportada en una columna, a través de la cual se bombea (Z) en las condiciones de reacción deseadas. Para aplicaciones especiales también se pueden conectar en serie cascadas de reactores enzimáticos para conseguir una reducción de formamida especialmente efectiva.

30 Con el procedimiento según la invención se consigue reducir drásticamente el contenido en formamida en preparados polímeros, que se obtuvieron a partir de N-vinilformamida mediante polimerización, y alcanzar con ello contenidos en formamida residual de menos de 50, preferentemente menos de 20, en especial menos de 10 ppm.

#### Parte experimental

35 Las "unidades" de actividad enzimática se refieren, si no se indica lo contrario, a la hidrólisis de urea para dar amoniaco.

El contenido en formamida en la disolución acuosa se cuantificó por medio de HPLC.

#### Ejemplo 1

##### Degradación de formamida residual con extracto de harina de habas gigantes

40 Se extrajo harina de habas gigantes ("Jack bean meal" firma Sigma) con agua, se aclaró mediante centrifugado, y se concentró por medio de ultrafiltración. Se obtuvo un extracto que contenía ureasa con 1101 U/ml.

Se añadieron diversas cantidades de este extracto de ureasa a una disolución al 16 % en peso de una poli(vinilformamida) en agua (masa total de carga 50 g), y se agitó a 40°C y pH 7,0. El enzima se desnaturizó mediante acidificado para detener la reacción.

## ES 2 376 250 T3

| Cantidad de enzima [kU] | Tiempo de reacción | Contenido residual en formamida [ppm] |
|-------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Sin                     | 0h                 | 1600                                  |
| Sin                     | 24h                | 1700                                  |
| 5                       | 6h                 | 990                                   |
| 5                       | 24h                | 420                                   |
| 10                      | 6h                 | 600                                   |
| 10                      | 24h                | 80                                    |
| 15                      | 6h                 | 320                                   |
| 15                      | 24h                | 40                                    |

### Ejemplo 2

Degradación de formamida residual con liofilizado de harina de habas gigantes

- 5 El extracto descrito en el ejemplo 1 se liofilizó. Se obtuvo un polvo que contenía ureasa con una actividad de 17926 U/g.

Se introdujeron diversas cantidades de este polvo de ureasa a 50 g de una disolución al 16 % en peso de una poli(vinilformamida) en agua, y se agitó a 40°C y pH 7,0. El enzima se desnaturalizó mediante acidificado para detener la reacción.

| Cantidad de enzima [kU] | Tiempo de reacción | Contenido residual en formamida [ppm] |
|-------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Sin                     | 24h                | 1700                                  |
| 1,25                    | 24h                | 790                                   |
| 2,5                     | 24h                | 390                                   |
| 5                       | 24h                | 100                                   |
| 10                      | 24h                | 10                                    |
| 15                      | 6h                 | 230                                   |
| 15                      | 24h                | < 10                                  |

10

### Ejemplo 3

Degradación de formamida residual con extracto de harina de habas de soja

Se extrajo harina de habas de soja (firma Sigma) con agua, se aclaró mediante centrifugado, y se concentró por medio de ultrafiltración. Se obtuvo un extracto que contenía ureasa con 292 U/ml.

- 15 Se añadieron diversas cantidades de este extracto de ureasa a una disolución al 16 % en peso de una poli(vinilformamida) en agua (masa total de carga 50 g), y se agitó a 40°C y pH 7,0. El enzima se desnaturalizó mediante acidificado para detener la reacción.

## ES 2 376 250 T3

| Cantidad de enzima [kU] | Tiempo de reacción | Contenido residual en formamida [ppm] |
|-------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Sin                     | 24h                | 1700                                  |
| 5                       | 6h                 | 1220                                  |
| 5                       | 24h                | 610                                   |
| 7,3                     | 6h                 | 1150                                  |

### Ejemplo 4

Degradación de formamida residual con ureasa comercial

5 Una ureasa purificada a partir de habas ensiformes es adquirible comercialmente en la firma Fluka (nº de pedido 94282). La actividad respecto a la hidrólisis de urea asciende aproximadamente a 35 unidades por mg de proteína.

Se añadieron diversas cantidades de este extracto de ureasa a una disolución al 16 % en peso de una poli(vinilformamida) en agua (masa total de carga 50 g), y se agitó a 40°C y pH 7,0. El enzima se desnaturizó mediante acidificado para detener la reacción.

| Cantidad de enzima [kU] | Contenido residual en formamida [ppm] |
|-------------------------|---------------------------------------|
| Sin                     | 1500                                  |
| 28,5 mg (1 kU)          | 570                                   |
| 57mg (2 kU)             | 170                                   |
| 114 mg (4 kU)           | 14                                    |
| 171 mg (6 kU)           | <10                                   |
| 229 mg (8 kU)           | <10                                   |

### 10 Ejemplo 5

Degradación de formamida residual con ureasa comercial a diferente temperatura y tiempo, así como en concentración de polímero más elevada que en el ejemplo 4

Una ureasa purificada a partir de habas ensiformes es adquirible comercialmente en la firma Fluka (nº de pedido 94282). La actividad respecto a la hidrólisis de urea asciende aproximadamente a 35 unidades por mg de proteína.

15 Se añadieron diversas cantidades de este extracto de ureasa a una disolución al 32 % en peso de una poli(vinilformamida) en agua (masa total de carga 150 g), y se agitó a 40°C y pH 7,0. El enzima se desnaturizó mediante acidificado para detener la reacción.

## ES 2 376 250 T3

| Cantidad de enzima | Contenido residual |           | Contenido residual |
|--------------------|--------------------|-----------|--------------------|
|                    | formamida [ppm]    |           | formamida [ppm]    |
|                    | tras 8 h           | tras 24 h | tras 72 h          |
| 0                  | -                  | 3400      | -                  |
| 7,5 kU             | -                  | -         | 220                |
| 15 kU              | 1170               | 270       | 70                 |
| 30 kU              | 610                | 25        | 20                 |
| 60 kU              | 140                | 40        | -                  |

### Ejemplo 6

Degradación de formamida residual con ureasa comercial de *Bacillus pasteurii*

- 5 Una ureasa purificada a partir *Bacillus pasteurii* es adquirible comercialmente en la firma Sigma (nº de pedido U7127). La actividad respecto a la hidrólisis de urea asciende aproximadamente a 197 unidades por mg de proteína.

Se añadieron diversas cantidades de este extracto de ureasa a una disolución al 16 % en peso de una poli(vinilformamida) en agua (masa total de carga 20 g), y se agitó a 40°C y pH 7,5. El enzima se desnaturizó mediante acidificado para detener la reacción.

| Cantidad de enzima | Contenido residual en formamida [ppm] |
|--------------------|---------------------------------------|
| Sin                | 1200                                  |
| 10 kU              | 400                                   |
| 20 kU              | 120                                   |

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Procedimiento para la reducción del contenido en formamida de preparados (Z), que se obtienen a partir de monómeros de N-vinilformamida mediante polimerización, poniéndose en contacto una hidrolasa de clasificación de enzima E. C. 3.5.1.5. con (Z), reduciéndose el contenido en formamida a menos de 50 ppm.
- 5 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se ponen en contacto (Z) e hidrolasa a un valor de pH entre 3-10.
- 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se ponen en contacto (Z) e hidrolasa a una temperatura entre 5 y 100°C.
- 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque (Z) se presenta como disolución acuosa.
- 10 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque (Z) es un homopolímero de N-vinilformamida.
- 6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el procedimiento se lleva a cabo continuamente.