

Brevet N°

84920

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG

du 18 juillet 1983

Titre délivré : 23 NOV. 1983



Monsieur le Ministre
de l'Économie et des Classes Moyennes
Service de la Propriété Intellectuelle
LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

La société dite: GENEX CORPORATION, 6110 Executive Boulevard, (1)
à ROCKVILLE, Maryland 20852, Etats-Unis d'Amérique, représentée
par Monsieur Jacques de Muyser, agissant en qualité de man- (2)
dataire

dépose(nt) ce dix-sept juillet 1983 quatre-vingt-trois (3)
à 15 heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg :

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant :
"Procédé d'immobilisation de substances biologiques par ab- (4)
sorption dans un support de vermiculite".

2. la délégation de pouvoir, datée de ROCKVILLE, MD le 9 juin 1983

3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires;

4. // planches de dessin, en deux exemplaires;

5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,
le 18 juillet 1983

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) :
Wayne Elliott SWANN, 5392 Storm Drift, à COLUMBIA, Maryland (5)
21045, Etats-Unis d'Amérique

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de
(6) brevet déposée(s) en/ (7) aux Etats-Unis d'Amérique
le 20 juillet 1982 (No. 400,141) et le 7 février 1983 (8)
(No. 464,376) (C-i-p application)

au nom de l'inventeur
domicile
est(élisent) pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg (9)
35, bld. Royal (10)

solicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les
annexes susmentionnées, — avec ajournement de cette délivrance à // mois. (11)

Le mandataire

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des
Classes Moyennes, Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du :

18 juillet 1983

à 15 heures



Pr. le Ministre
de l'Économie et des Classes Moyennes,
p. d.

REVENDEICATION DE LA PRIORITE

de la demande de brevet / ~~du~~ ~~modèle~~ ~~d'utilité~~ /

~~En~~ Aux ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Du 20 juillet 1982

Du 7 février 1983 (C-i-p application)

Mémoire Descriptif

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

au

Luxembourg

au nom de : GENEX CORPORATION

pour : "Procédé d'immobilisation de substances biologiques par
absorption dans un support de vermiculite".

Procédé d'immobilisation de substances
biologiques par absorption dans un support
de vermiculite

5 La présente invention concerne un procédé
d'immobilisation de substances biologiques. Plus
particulièrement, l'invention concerne l'immobilisation de
substances biologiques consistant à faire absorber les
substances par des particules de vermiculite que l'on revêt
10 ensuite d'un polymère.

Des substances biologiques telles que les enzymes
ou les micro-organismes ou les cellules produisant des enzymes
sont souvent utilisées comme catalyseurs pour des réactions
de synthèse et pour des techniques d'analyse. De tels
15 catalyseurs sont souhaitables car ils opèrent avec une
grande spécificité et un très bon rendement dans des
conditions de réaction généralement douces.

Comme les enzymes et autres bio-catalyseurs sont
généralement solubles dans l'eau elles conviennent pour
20 l'utilisation dans des systèmes réactionnels de type
discontinu. La réutilisation de telles enzymes et de tels
autres bio-catalyseurs est limitée du fait de difficultés de
récupération, sous une forme active ou utilisable, de ces
substances à partir du milieu réactionnel utilisé. Par ailleurs,
25 ces substances ont tendance à rester dans le produit préparé
sous forme d'impuretés. Afin d'éviter ces problèmes, des
procédés ont été mis au point pour immobiliser les substances
biologiques qui font preuve d'une activité catalytique sur
les supports solides insolubles. L'immobilisation est censée
30 avoir pour résultat une substance biologique stabilisée
capable de résister aux rigueurs d'un usage répété ou continu.

L'existence de plusieurs systèmes d'immobilisation
pour les substances biologiques a été rapportée. Des enzymes
ont été immobilisées par absorption sur des substances
35 insolubles telles que le charbon, le verre, la cellulose, un
gel de phosphate de calcium, la montmorillonite et les résines
organiques d'échange d'ions, entre autres. L'immobilisation a
également été réalisée par emprisonnement dans des gels

d'amidon et d'acrylamide, par liaison covalente entre des enzymes et des polymères organiques insolubles, ainsi que par liaison covalente entre les molécules d'enzyme elles-mêmes.

Les procédés de la technique antérieure aboutissent souvent à des produits d'activité biologique réduite, par rapport à celle de la substance biologique non liée correspondante. On sait que ces substances biologiques sont sensibles à la dénaturation ou à l'inactivation thermique et chimique. La perte d'activité biologique se produit souvent lorsque les opérations d'immobilisation sont menées dans des conditions très sévères, ce qui risque d'être particulièrement problématique lorsque des réactions de condensation de polymères entrent en jeu. Par ailleurs, les produits résultant des procédés selon la technique antérieure sont souvent désavantageux du point de vue de leur caractère hydrophile, de leur résistance mécanique, de leur durabilité et de leur porosité.

C'est par conséquent un objectif de la présente invention de mettre au point un procédé d'immobilisation de substances biologiques qui n'ait pas pour effet de réduire l'activité biologique des produits obtenus.

C'est un autre objectif de la présente invention de mettre au point un procédé d'immobilisation de substances biologiques grâce auquel les produits résultants fassent preuve d'excellentes propriétés de résistance mécanique, de durabilité, de porosité et de stabilité biologique. Encore un autre objectif de l'invention est de procurer un procédé d'immobilisation d'une grande quantité de substance biologique par unité de volume de support final (haute densité).

Il a maintenant été découvert que des substances biologiques pouvaient être immobilisées d'une manière simple et très économique tout en conservant un haut degré de leur activité catalytique. Le procédé selon la présente invention permet d'obtenir un composite de substance biologique insolubilisé qui contient la substance biologique emprisonnée

dans des particules de vermiculite revêtues d'un polymère. Suivant le polymère choisi et suivant la nature de la substance biologique emprisonnée dans la vermiculite, on peut avoir avantage à réticuler ou à condenser le polymère. Il se produit une très faible perte d'activité quand on prépare le composite, et les composites en question font preuve d'excellentes propriétés de résistance mécanique et de durabilité. Par ailleurs, lorsque le polymère est réticulé ou condensé, il est possible d'ajuster le caractère hydrophile de ces substances en faisant varier le degré de réticulation ou de condensation. Le procédé selon la présente invention permet d'obtenir un composite qui peut être séparé des mélanges réactionnels par simple filtration, ou bien qui peut être utilisé dans des procédés de réaction continus tels que ceux dans lesquels un substrat réagissant circule dans un réacteur en forme de colonne à garnissage.

Conformément au procédé selon la présente invention, on met les particules de vermiculite en contact avec la substance biologique, par exemple avec des cellules humides entières récoltées d'un bouillon de fermentation. La substance biologique est absorbée dans les particules de vermiculite. On ajoute à la vermiculite une matière de revêtement polymère de manière à en revêtir les particules. On peut ensuite ajouter divers agents de réticulation, de condensation et de gélification pour réticuler et renforcer le polymère et/ou la substance biologique et former un revêtement perméable dur. On peut facultativement combiner le polymère avec un polyacide carboxylique pour former un pré-polymère soluble dans l'eau, avant de le mélanger avec la vermiculite. Ce mode opératoire conduit à la formation d'un composite de substance biologique dans lequel la substance biologique est immobilisée à l'intérieur de la vermiculite revêtue de polymère.

L'immobilisation de la substance biologique au sein de la vermiculite peut se faire par emprisonnement physique, par liaison covalente du polymère par l'intermédiaire de l'agent de réticulation ou de condensation et des groupements

réactifs de la substance biologique, ou encore par
réticulation au sein des particules de vermiculite par
l'intermédiaire d'un agent de réticulation approprié. Par
5 exemple, lorsque le polymère est une polyalkylène-imine, la
substance biologique peut être immobilisée par liaison
covalente, étant donné que les groupements amine et carboxyle
de la substance biologique peuvent se substituer soit à un
groupement amine de la polyalkylène-imine soit à un groupement
10 carboxyle d'un polyacide carboxylique qui peut être ajouté à
la vermiculite revêtue. Une liaison covalente avec le
polymère se fait finalement par l'intermédiaire d'un agent de
condensation.

Le procédé selon la présente invention permet la
15 préparation d'une large variété de composites de substances
biologiques. La substance biologique peut se composer
d'enzymes, de cellules microbiennes, d'antigènes, d'anticorps,
d'antibiotiques, de co-enzymes, de cellules végétales, de
cellules animales, de bactéries, de levures, de champignons,
20 de cultures tissulaires, ou de mélanges des précédents. Il est
préférable d'ajouter les substances biologiques à la
vermiculite sous une forme aqueuse.

Il a été découvert que la vermiculite forme un
excellent support pour l'immobilisation des substances
25 biologiques. Les particules de vermiculite sont capables
d'absorber de très grandes quantités de substances
biologiques, ce qui se traduit par une charge de forte
densité. De plus, la vermiculite est très bon marché et
disponible en grande quantité, ce qui rend son utilisation
30 extrêmement bénéfique comme support dans la production à
grande échelle. Enfin, le support d'immobilisation résultant
de ce procédé d'immobilisation des substances biologiques
est rigide et extrêmement actif.

Il a été déterminé que la grosseur des particules
35 de la vermiculite utilisée dans le procédé d'immobilisation
selon la présente invention pouvait varier dans une large
mesure. Par exemple, la grosseur des particules de la
vermiculite peut varier d'une fine poudre à 1 cm environ,

de préférence d'environ 0,5 à 1 mm. La quantité de substance biologique ajoutée à la vermiculite peut varier en fonction de l'utilisation finale spécifique du composite de substance
5 biologique. D'une manière générale, elle va d'environ 0,001 à 2 g (poids sec) par gramme de vermiculite utilisée, de préférence d'environ 0,01 à environ 1 g par gramme de vermiculite.

Les composites de substance biologique qui sont
10 préparés par le procédé selon la présente invention peuvent être très différents du point de vue de leur caractère hydrophile, de leur résistance mécanique, de leur durabilité et de leur porosité. En diminuant le degré de réticulation ou de condensation du polymère utilisé pour revêtir la
15 vermiculite, il est possible d'obtenir un composite ayant un caractère hydrophile plus marqué. L'addition d'agents de réticulation multifonctionnels permet d'augmenter la résistance mécanique et la durabilité du composite polymère-vermiculite-substance biologique, les groupements
20 fonctionnels supplémentaires ayant pour effet d'augmenter la condensation du polymère et de donner naissance à un composite plus hydrophobe.

Il est possible d'augmenter la porosité globale de la matrice en ajoutant une substance en particules soluble
25 dans l'eau au polymère avant qu'il se condense complètement. On élimine ensuite la matière sèche en ajoutant de l'eau après condensation, ce qui dissout le solide. Les parties du composite qui avaient été déplacées par les solides restent inoccupées, augmentant ainsi la porosité de la matrice. Pour
30 augmenter la porosité du mélange, on peut utiliser n'importe quelle substance en particules soluble dans l'eau qui n'a pas d'effet néfaste significatif sur le polymère, la vermiculite ou la substance biologique. Les polyacides carboxyliques solubles dans l'eau, tels que ceux qui ont
35 réagi avec les polymères non condensés, conviennent particulièrement bien pour augmenter la porosité de la matrice, étant donné que les excès utilisés pour augmenter la porosité n'ont pratiquement pas d'influence sur les réactions

de condensation.

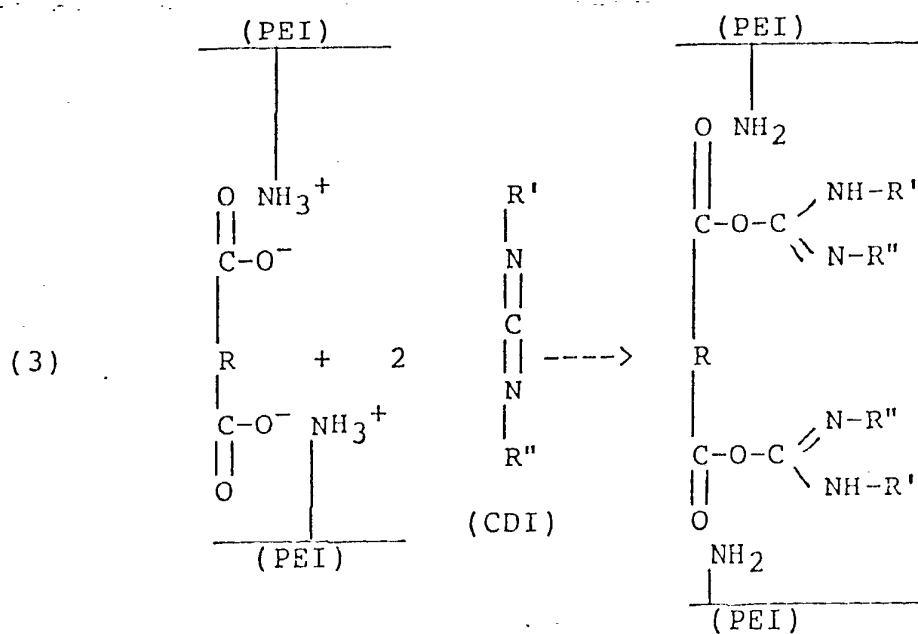
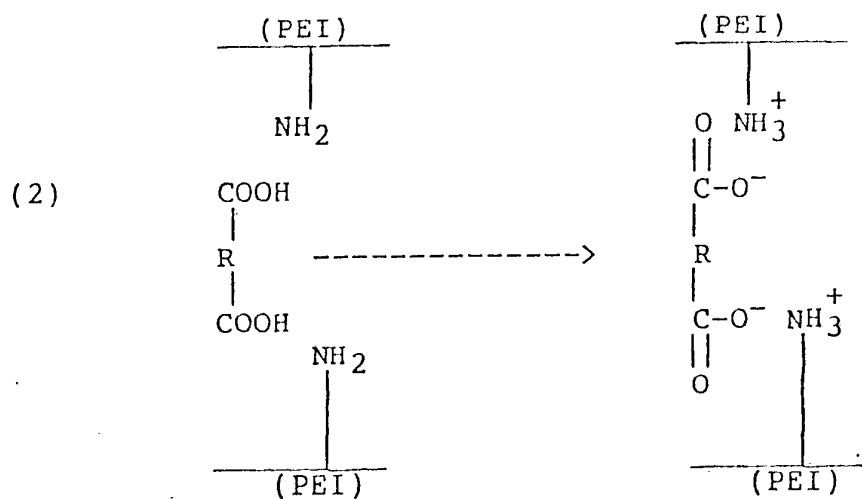
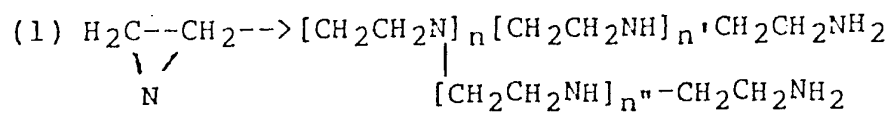
Les polymères utilisés dans le procédé et dans les composites selon la présente invention ont d'une manière générale un poids moléculaire variable, en fonction des conditions de réaction, et ont de préférence une structure à chaîne ramifiée. Des matières polymères très diverses peuvent être utilisées dans le procédé selon la présente invention, y compris des polyalkylène-imines, des polysaccharides, des polyacrylamides, des polyuréthanes, des alginates et la carraghénine. Les polymères préférés sont les polyalkylène-imines.

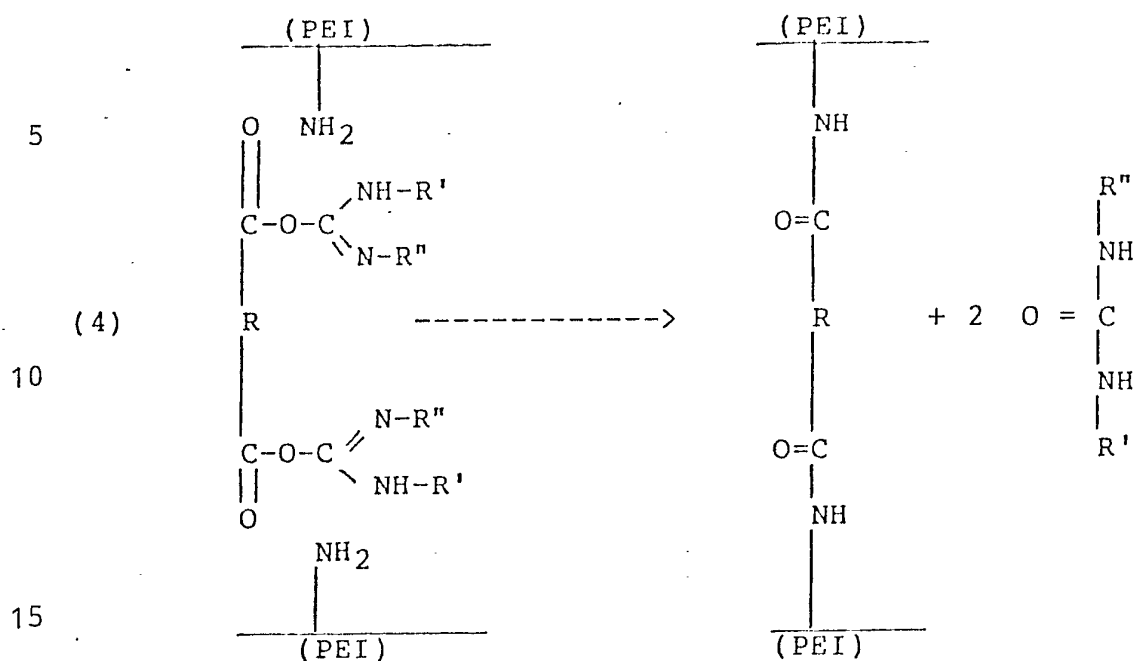
Les polyalkylène-imines peuvent être synthétisés par polymérisation par addition, catalysée par des acides, des monomères d'alkylène-imine. Une polyalkylène-imine préférée est la polyéthylène-imine (PEI) car elle est actuellement très disponible à un prix relativement bas, et elle se comporte bien dans les réactions de condensation utilisées dans le procédé selon la présente invention. La polyéthylène-imine est produite par polymérisation avec ouverture de cycle de l'éthylène-imine, en présence de catalyseurs tels que les acides minéraux. Le polymère est fortement ramifié et contient des groupements amine primaires, secondaires et tertiaires. La PEI est soluble dans l'eau, et lors de la réticulation ou de la condensation des chaînes de polymère, il se forme un produit insoluble dans l'eau.

La polyéthylène-imine peut être réticulée à l'aide d'un agent de réticulation des fonctions amine pour lui conférer un supplément de stabilité et de résistance mécanique. Ce traitement a pour résultat une substance biologique emprisonnée, avec une certaine réticulation entre la polyalkylène-imine et les groupements amine libres de la substance biologique. Les agents de réticulation comprennent le dialdéhyde glutarique, les diisocyanates, les polyisocyanates, la 2,4,6-trichloro-S-triazine, le bisoxirane, le bisimidate, la divinylsulfone, le 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzène, et les agents de réticulation similaires. On préfère le dialdéhyde glutarique à cette fin.

D'une manière générale, on ajoute le polymère choisi au composite en quantité suffisante pour qu'il revête pratiquement en totalité les particules de vermiculite, et
5 cette quantité varie d'une manière importante en fonction de la grosseur des particules de la vermiculite, de la nature des substances biologiques et des propriétés physiques que l'on veut obtenir. D'une manière générale, le polymère peut représenter d'environ 0,5 à environ 25 % du poids du
10 composite, et représente de préférence d'environ 2 % à environ 15 % du poids du composite. La quantité d'agent de réticulation et/ou de condensation utilisée est fonction de la quantité de polymère, ainsi qu'on l'exposera ci-après.

Lorsque le polymère est la polyéthylène-imine, un
15 procédé de condensation extrêmement efficace fait appel à un polyacide carboxylique (PCA) pour "ponter" les groupements amine sur des chaînes de PEI adjacentes. Les agents de condensation, qui sont de préférence des carbodiimides, provoquent facilement la condensation. Les réactions mises en
20 jeu dans la préparation de la polyéthylène-imine condensée selon la présente invention sont illustrées ci-dessous :





La réaction (1) illustre la polymérisation de l'éthylène-imine pour former la PEI ayant une structure à chaîne ramifiée, n et n' étant des nombres entiers plus grands que 0 et n'' pouvant être égal à 0 (ce qui indique que le groupement $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}]$ est absent) ou être plus grand que 0. La réaction (2) montre la formation d'un sel des groupements amine de la PEI avec un polyacide carboxylique, R pouvant être un groupement hydrocarboné substitué ou non substitué. Les réactions (3) et (4) montrent la condensation de la PEI et du polyacide carboxylique, en utilisant un carbodiimide comme agent de condensation. R et R' sont des groupements hydrocarbonés qui, de même que les autres produits réagissants et que les conditions des réactions illustrées, vont être décrits plus complètement ci-dessous.

En général, les polyacides carboxyliques qui conviennent à l'utilisation dans la présente invention peuvent être des acides carboxyliques substitués ou non substitués ayant au moins deux groupements carboxyle. De préférence, ces polyacides carboxyliques sont solubles dans l'eau, si bien qu'on peut les utiliser éventuellement pour augmenter la porosité du composite, ainsi que pour condenser

la polyalkylène-imine. Des exemples de polyacides carboxyliques que l'on peut utiliser dans les procédés et dans les composites selon la présente invention comprennent les acides
5 adipique, azélaïque, 1,11-undécanedioïque, 1,12-dodécane-
dioïque, traumatique, pentadécanedioïque, hexadécanedioïque, sébacique, subérique, glutarique, malonique, pimellique, succinique, malique, maléique, glutamique, aspartique, oxalique, fumarique, polyaspartique, etc. Selon la présente
10 invention, on préfère utiliser les diacides carboxyliques, qui comprennent l'acide maléique, l'acide succinique, l'acide glutarique et l'acide adipique. Les polyacides carboxyliques supérieurs peuvent être n'importe quelle substance qui contient au moins deux groupements acide
15 carboxylique, et comprennent des substances polymères de haut poids moléculaire, telles que l'acide polyaspartique, dont le poids moléculaire peut aller de 5.000 à 50.000. Les réactions de condensation sont généralement exothermiques, aussi a-t-on
avantage à refroidir les mélanges réactionnels à une
20 température qui n'ait pas d'effet néfaste sur la substance biologique à immobiliser, par exemple à une température de 37° environ ou moins.

Le rapport molaire du polyacide carboxylique à la polyalkylène-imine (PCA:PAI) peut varier dans une large
25 mesure, du fait de la variation de poids moléculaire des produits réagissants. D'une manière générale, ce rapport s'échelonne de 1:20 à 1:0,0005. Dans le cas où l'on ajoute un polyacide carboxylique pour augmenter la porosité du composite selon la présente invention, on utilise souvent un excès
30 molaire considérable du polyacide carboxylique.

Le polyacide carboxylique peut être ajouté à la polyalkylène-imine dans une quantité propre à provoquer la condensation, dans des conditions de prépolymérisation, de façon à former un prépolymère soluble dans l'eau. Ce pré-
35 polymère est généralement un liquide visqueux, auquel on peut commodément ajouter la vermiculite contenant la substance biologique immobilisée, laquelle peut être maintenue en suspension au cours de la réaction de condensation. On ajoute

ensuite l'agent de condensation pour provoquer la condensation et la solidification du composite prépolymère-vermiculite.

On maintient le pH du mélange réactionnel à un niveau tel que

5 la substance biologique ne subisse pas d'inactivation ou d'effet néfaste. Ce pH peut s'échelonner de 2 environ à 12 environ et est de préférence compris entre 5 environ et 10 environ.

Comme indiqué ci-dessus, pour provoquer la

10 condensation des chaînes de polyalkylène-imine par l'intermédiaire de polyacides carboxyliques, on a avantage à employer un agent de condensation. D'une manière générale, on peut utiliser n'importe quel agent de condensation qui catalyse ou facilite la réaction des amines et des acides

15 carboxyliques. Des exemples de tels agents de condensation comprennent le N-éthyl-5-phénylisoazolium-3-sulfonate, la N-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoléine, et divers carbodiimides. Les carbodiimides que l'on peut utiliser comme agents de condensation dans la composition selon la

20 présente invention ont pour formule $R'-N=C=N-R''$, dans laquelle R' et R'' sont des groupements hydrocarbonés contenant de 3 à environ 20 atomes de carbone, de préférence d'environ 5 à environ 12 atomes de carbone. Ces agents de condensation comprennent le 1-éthyl-3,3-diméthylamino-

25 propyl carbodiimide, le dicyclohexyl carbodiimide, le métho-para-toluène sulfonate de 1-cyclohexyl-3-(2-morpholino-éthyl)carbodiimide, et les sels des précédents. On ajoute les carbodiimides au mélange réactionnel dans une quantité propre à provoquer la condensation, laquelle est généralement égale

30 à la quantité stoechiométrique, par exemple d'environ 0,2 à 3 fois, de préférence d'environ 0,5 à 1,5 fois, la quantité exactement stoechiométrique. Chaque molécule de carbodiimide réagit avec un seul groupement acide du polyacide carboxylique. Par exemple, on utilise généralement, dans le procédé selon la

35 présente invention, des rapports molaires carbodiimide-diacide carboxylique de 2:1 environ. Lors de l'addition de l'agent de condensation à la température ambiante, il se produit une polymérisation notable dans un délai de 30 secondes, et cette

polymérisation est généralement complète dans un délai de deux heures environ.

Une fois que la polyéthylène-imine a été
5 insolubilisée par addition d'un agent de condensation, un post-traitement facultatif consiste à réticuler la vermiculite condensée et revêtue, à l'aide d'un agent de réticulation des fonctions amine, tel que le dialdéhyde glutarique, comme décrit ci-dessus, pour conférer un
10 supplément de résistance mécanique et de stabilité au composite final.

Suivant le type de polymère choisi, des agents de condensation et de réticulation très divers peuvent être choisis parmi ceux qui sont connus dans la technique pour
15 renforcer le composite. En utilisant les procédés décrits dans la présente invention, il est possible d'immobiliser une large variété de substances biologiques pour produire de nouveaux composites biocatalytiques. Dans les exemples suivants, les modes opératoires d'immobilisation sont
20 décrits plus en détail. Ces exemples décrivent la manière et le procédé de réalisation et d'utilisation de l'invention et exposent diverses formes de réalisation de l'invention, mais ne doivent pas être considérés comme la limitant.

EXEMPLE I

25 On a préparé, à partir de E. coli contenant de l'aspartase fraîche, 80 g d'une pâte de cellules de E. coli contenant de l'aspartase, cette pâte contenant environ 75 % en poids d'eau. Pour confectionner cette pâte, on a préparé le milieu de fermentation en dissolvant, dans un litre d'eau,
30 24 g d'extrait de levure, 30 g d'acide fumarique, 2 g de carbonate de sodium, 2 mmoles de sulfate de magnésium et 0,1 mmole de chlorure de calcium, et on a ajusté le pH à 7,2 environ à l'aide d'ammoniaque. A ce milieu on a inoculé 1 ml d'une culture de E. coli (ATCC N° 31976) que l'on avait fait
35 incuber pendant 12 à 16 heures à 37°C dans un milieu de peptone contenant 0,5 % de glutamate monosodique. On a fait incuber ce milieu inoculé pendant 12 à 14 heures à 37°C. On a récolté les cellules par centrifugation à 5000 tours par

minute pendant 30 minutes.

On a ajouté les 80 g de E. coli contenant de l'aspartase à 20 g de particules de vermiculite. Après avoir
5 laissé la vermiculite absorber la pâte de cellules, on a ajouté au mélange 10 g de polyéthylène-imine et on a agité jusqu'à obtenir une répartition uniforme. On a ensuite
ajouté du dialdéhyde glutarique (20 g d'une solution à 25 % dans l'eau) et on a mélangé jusqu'à ce qu'il se forme des
10 particules dures. Par le même mode opératoire, on a préparé un second lot de substance. On a laissé sécher pendant une nuit les deux lots de substance.

On a garni une colonne de la substance ci-dessus, avec un volume final de lit de 353 cm³. On a ensuite utilisé
15 la colonne pour transformer du fumarate d'ammonium en acide L-aspartique. On a fait passer dans la colonne, à un débit de 360 cm³/h (1,0 SV^{h-1}) une solution 1,5 M de fumarate d'ammonium avec 1 mmole de sulfate de magnésium, pH 8,5. On a surveillé l'activité aspartase de l'effluent en mesurant
20 la disparition de l'acide fumarique sur un spectrophotomètre à 240 nm. La colonne a fonctionné sans interruption pendant 151 jours. Pendant ce temps, on a analysé des échantillons de l'effluent de la colonne pour déterminer le pourcentage de transformation du substrat. Les résultats sont donnés dans le
25 tableau 1 ci-dessous.

TABLEAU 1

	Jour	% de transformation du fumarate d'ammonium 1,5 M (1 passe à 1 SV/h)
30	1	98,2
	6	99,2
	16	99,4
	26	99,2
	37	99,0
	55	98,7
35	90	98,2
	120	91,0
	151	91,3

EXEMPLE II

40 On a suivi le mode opératoire général de l'Exemple

I en utilisant 120 g de pâte de cellules et 15 g de polyéthylène-imine. Avec un lot de substance immobilisée on a garni un réacteur en forme de colonne d'un volume de lit de 5 173 cm³. On a réussi, avec cette colonne, à transformer 99 % d'une solution de fumarate d'ammonium 1,8 M à un débit de 360 cm³/h (2,08 SV^{h-1}). On a calculé le rendement de cette colonne comme étant égal à 493 g d'acide L-aspartique produit par litre de volume de lit de cellules immobilisées par heure 10 à 37°C (3,7 moles/l/h).

EXEMPLE III

On a préparé dix lots de cellules immobilisées de E. coli (100 g de vermiculite par lot) par le mode opératoire général de l'Exemple II.

15 On a ensuite garni, avec ce biocatalyseur, une colonne d'un volume de lit de 12,5 litres. On a fait passer dans cette colonne, à divers débits, du fumarate d'ammonium (1,8 M) à 37°C, et on a analysé l'effluent pour déterminer le pourcentage de transformation du fumarate d'ammonium, 20 comme dans l'Exemple I. Le Tableau 2 ci-dessous donne les résultats des essais.

TABLEAU 2

Débit (l/h)	% de transformat. (acide fumarique)	Kg/h (acide L- aspartique)	Moles/l/h (acide L- aspartique)
25 12,50	99,1	2,97	1,79
18,75	97,5	4,38	2,63
25,00	95,0	5,69	3,42
62,50	56,00	8,38	5,04

EXEMPLE IV

30 On a répété le mode opératoire général de l'Exemple III avec un lot frais de cellules de E. coli, à cela près que les cellules fraîches avaient une activité supérieure de 29 % à celle du lot précédent. Lorsqu'on a fait passer le 35 substrat dans la colonne à un débit de 62,5 l/h (comme dans l'Exemple III), on a constaté que la quantité d'acide aspartique produite était de 10,56 kg/h (6,35 moles/l/h). Cela représente une augmentation de rendement de 27 % par rapport à l'Exemple III.

EXEMPLE V

Une enzyme, la synthétase de tryptophane, peut être utilisée dans le procédé selon l'invention pour catalyser la transformation de l'indole et de la sérine en tryptophane. On a mélangé des particules de vermiculite (2 g) avec 4 ml d'une solution d'un extrait de synthétase de tryptophane brute obtenue à partir de cellules de E. coli. On a laissé la vermiculite absorber cet extrait. On a ensuite ajouté au mélange 1 g de polyéthylène-imine pour en revêtir les particules de vermiculite. On a ensuite ajouté du dialdéhyde glutarique (2 ml d'une solution à 25 % dans l'eau) et on a mélangé jusqu'à ce qu'il se forme des particules revêtues dures. On a ensuite placé la totalité de la substance dans une colonne que l'on a fait traverser par une solution de substrat composée de sérine 0,05 M, d'indole 0,05 M, de glutathione 0,005 M, de phosphate de potassium dibasique 0,005 M et de 200 mg de pyridoxal-5-phosphate/litre, le pH étant ajusté à 7,8. On a ensuite utilisé la colonne à plusieurs reprises dans un dispositif de recirculation discontinu pour produire 80 mg de L-tryptophane en 24 heures.

EXEMPLE VI

On a mélangé 9 g de cellules de levure entières R. rubra contenant une enzyme, l'ammonia-lyase de phényl-alanine, avec 3 g de particules de vermiculite, on a laissé les particules de vermiculite absorber et se recouvrir des cellules, puis on a refroidi à 10°C. On a préparé une solution de revêtement à base de polysaccharide en ajoutant 0,8 g de poudre de polysaccharide Kelco (K9A50) dans 100 ml d'eau désionisée à 80°C et en agitant pendant 10 minutes. La poudre s'est dissoute et on a ajouté à la solution 1 g de chlorure de potassium. On a laissé la solution se refroidir à 50°C (tout en restant une solution). On a ensuite versé la solution chaude sur la vermiculite froide, tout en mélangeant. Le polysaccharide a formé très rapidement un gel, revêtant les particules de vermiculite qui contenaient R. rubra. On a placé les particules dans 100 ml d'un tampon de phosphate de potassium 0,1 M, pH 7,0, et on a lavé soigneusement en

agitant. On a séparé les particules de la solution tampon. La solution n'a fait apparaître aucun signe de nébulosité ou de trouble et était pratiquement dépourvue de cellules de 5 levure, ce qui indiquait que l'immobilisation avait réussi. On a placé les particules dans 50 ml de cinnamate d'ammonium 0,1 M à pH 9,3, et on a analysé l'activité PAL de la solution en surveillant la production de L-phénylalanine. La substance à base de cellules immobilisées a réussi à produire de la L- 10 phénylalanine ; on a observé dans la solution réactionnelle des quantités de L-phénylalanine croissant avec le temps.

REVENDEICATIONS

1. Procédé d'immobilisation de substances biologiques par préparation d'un composite de substance
5 biologique insolubilisé, caractérisé en ce qu'il consiste :
 - (a) à ajouter des particules de vermiculite à un milieu aqueux de substance biologique ;
 - (b) à laisser ladite vermiculite absorber ledit milieu aqueux de substance biologique ; et
 - 10 (c) à revêtir ladite vermiculite d'un polymère.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on réticule la vermiculite revêtue de l'étape (c) à l'aide d'un agent de réticulation, ou bien on la condense à
15 l'aide d'un agent de condensation.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le polymère est une polyalkylène-imine, un polysaccharide, un polyacrylamide, un polyuréthane, un alginate, ou une carraghénine.
- 20 4. Procédé d'immobilisation de substances biologiques par préparation d'un composite de substance biologique insolubilisé, caractérisé en ce qu'il consiste :
 - (a) à ajouter des particules de vermiculite à un milieu aqueux de substance biologique ;
 - 25 (b) à laisser ladite vermiculite absorber ledit milieu aqueux de substance biologique ;
 - (c) à revêtir ladite vermiculite d'un polymère de polyalkylène-imine ; et
 - (d) à réticuler ladite vermiculite revêtue à
30 l'aide d'un agent de réticulation des fonctions amine, ou à condenser ladite vermiculite à l'aide d'un agent de condensation.
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'on mélange ladite vermiculite revêtue de polymère
35 avec une quantité appropriée d'un agent de réticulation des fonctions amine de façon à immobiliser la substance biologique au sein de ladite vermiculite revêtue.
6. Procédé selon la revendication 4, caractérisé

en ce qu'on mélange ledit polymère de polyalkylène-imine avec une quantité, propre à provoquer la condensation, d'un polyacide carboxylique, de façon à former un polymère soluble
5 dans l'eau pré-condensé et partiellement polymérisé, avant de le mélanger avec ladite vermiculite.

7. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'on condense ladite vermiculite revêtue en lui ajoutant une quantité appropriée d'un agent de condensation
10 qui est un carbodiimide, dans des conditions propres à provoquer la condensation.

8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on condense ladite vermiculite revêtue en lui ajoutant une quantité appropriée d'un agent de condensation
15 qui est un carbodiimide, dans des conditions propres à provoquer la condensation.

9. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce qu'il consiste en outre à modifier le composite de substance biologique insolubilisé en lui faisant
20 subir un post-traitement par un agent de réticulation des fonctions amine de façon à lui conférer un supplément de résistance mécanique et de stabilité.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, caractérisé en ce que le polymère de
25 polyalkylène-imine est une polyéthylène-imine, une polypropylène-imine, une polybutylène-imine ou une polypentylène-imine.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, caractérisé en ce que le polymère de
30 polyalkylène-imine est une polyéthylène-imine.

12. Procédé selon la revendication 6 ou 8, caractérisé en ce que le polyacide carboxylique est l'acide maléique, l'acide succinique ou l'acide adipique.

13. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que le carbodiimide utilisé comme agent de
35 condensation est le chlorhydrate de 1-éthyl-3,3-diméthylaminopropyl carbodiimide, le dicyclohexyl carbodiimide, le métho-para-toluène sulfonate de 1-cyclohexyl-3-(2-morpholino-

éthyl)carbodiimide, ou un sel des précédents.

14. Procédé selon la revendication 4 ou 5, caractérisé en ce que ledit agent de réticulation des 5 fonctions amine est le dialdéhyde glutarique, un diisocyanate, un polyisocyanate, la 2,4,6-trichloro-S-triazine, le bisoxirane, le bisimidate, la divinyl-sulfone, ou le 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzène.

15. Procédé selon la revendication 1 ou 4, 10 caractérisé en ce que la quantité de ladite substance biologique que l'on ajoute à ladite vermiculite est d'environ 0,001 à environ 2 g, en poids sec, par gramme de vermiculite.

16. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le rapport molaire de la polyalkylène-imine au 15 polyacide carboxylique est d'environ 1:20 à 1:0,0005.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'on utilise le carbodiimide dans une quantité d'environ 0,2 à 3 fois la quantité stoechiométrique par rapport au polyacide carboxylique.

20 18. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'on utilise le carbodiimide dans une quantité d'environ 0,5 à 1,5 fois la quantité stoechiométrique par rapport au polyacide carboxylique.

19. Procédé selon la revendication 1 ou 4, 25 caractérisé en ce que la substance biologique immobilisée est une enzyme, des cellules microbiennes, un antigène, un anticorps, un antibiotique, une co-enzyme, une bactérie, une levure, un champignon, des cellules végétales, des cellules animales, ou une culture tissulaire.

30 20. Procédé selon la revendication 1 ou 4, caractérisé en ce que la substance biologique est de l'aspartase d'origine microbienne.

21. Procédé selon la revendication 1 ou 4, caractérisé en ce que l'enzyme est la synthétase de 35 tryptophane.

22. Composite de substance biologique insolubilisé, caractérisé en ce qu'il comprend une substance biologiquement active adsorbée dans des particules de vermiculite qui sont

immobilisées au sein d'un polymère.

23. Composite de substance biologique insolubilisé, caractérisé en ce qu'il comprend une substance biologiquement
5 active adsorbée dans des particules de vermiculite qui sont immobilisées au sein d'un polymère, ledit polymère étant réticulé par un agent de réticulation.

24. Composite de substance biologique insolubilisé selon la revendication 23, caractérisé en ce que le polymère
10 est une polyalkylène-imine et l'agent de réticulation est un agent de réticulation des fonctions amine.

25. Composite selon la revendication 24, caractérisé en ce que l'agent de réticulation des fonctions amine est le dialdéhyde glutarique, un diisocyanate, un
15 polyisocyanate, la 2,4,6-trichloro-S-triazine, le bisoxirane, le bisimide, la divinylsulfone ou le 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzène.

26. Composite selon la revendication 24, caractérisé en ce que l'agent de réticulation des fonctions
20 amine est le dialdéhyde glutarique.

27. Composite de substance biologique insolubilisé, caractérisé en ce qu'il comprend une substance biologiquement active adsorbée dans des particules de vermiculite qui sont immobilisées au sein d'un polymère, ledit polymère étant
25 condensé par un agent de condensation.

28. Composite de substance biologique insolubilisé selon la revendication 27, caractérisé en ce que le polymère est une polyalkylène-imine et l'agent de condensation est un carbodiimide.

30 29. Composite selon la revendication 28, caractérisé en ce que l'agent de condensation est le chlorhydrate de 1-éthyl-3,3-diméthylaminopropyl carbodiimide, le dicyclohexyl carbodiimide ou le métho-para-toluène sulfonate de 1-cyclohexyl-3(2-morpholino-éthyl)carbodiimide, ou un sel des
35 précédents.

30. Composite selon la revendication 24 ou 26, caractérisé en ce que le polymère de polyalkylène-imine est une polyéthylène-imine, une polypropylène-imine, une poly-

butylène-imine ou une polypentylène-imine.

31. Composite selon la revendication 22, 23, 24, 27 ou 28, caractérisé en ce que la substance biologiquement active est une enzyme, des cellules microbiennes, un antigène, un anticorps, un antibiotique, une co-enzyme, des cellules végétales, des cellules animales, une bactérie, une levure, un champignon ou une culture tissulaire.

32. Composite selon la revendication 22, 23, 24, 27 ou 28, caractérisé en ce que la substance biologiquement active est l'aspartase.

33. Composite selon la revendication 22, 23, 24, 27 ou 28, caractérisé en ce que la substance biologiquement active est la synthétase de tryptophane.

34. Procédé de fabrication de l'acide aspartique, caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en contact, dans des conditions propres à produire de l'acide aspartique, un substrat contenant du fumarate d'ammonium, avec un composite de substance biologique insolubilisé, constitué d'aspartase ou de cellules microbiennes contenant de l'aspartase absorbée(s) dans des particules de vermiculite et immobilisée(s) au sein d'un polymère, la vermiculite immobilisée étant réticulée par un agent de réticulation ou condensée par un agent de condensation.

35. Procédé de fabrication du tryptophane, caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en contact, dans des conditions propres à produire du tryptophane, un substrat contenant de l'indole et de la sérine, avec un composite de substance biologique insolubilisé, constitué de synthétase de tryptophane ou de cellules microbiennes contenant de la synthétase de tryptophane, absorbée(s) dans des particules de vermiculite et immobilisée(s) au sein d'un polymère, la vermiculite immobilisée étant réticulée par un agent de réticulation ou condensée par un agent de condensation.

36. Procédé de fabrication de la L-phénylalanine, caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en contact, dans des conditions propres à produire de la L-phénylalanine, un substrat contenant du cinnamate d'ammonium, avec un composite

de substance biologique insolubilisé, constitué d'ammonia-
lyase de phénylalanine ou de cellules microbiennes contenant
de l'ammonia-lyase de phénylalanine, absorbée(s) dans des
5 particules de vermiculite et immobilisée(s) au sein d'un
polymère.