



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2008 00282

(22) Data de depozit: 16.04.2008

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: 30.05.2011 BOPI nr. 5/2011

(41) Data publicării cererii:  
30.10.2009 BOPI nr. 10/2009

(73) Titular:

• UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,  
BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 36-46,  
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

• UDREA ION, INTRAREA VASILE PĂUN  
NR.5, AP.12, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• SÂRBU ANDREI, STR.VALEA OLTULUI  
NR.16, BL.A 28, SC.C, ET.2, AP.37,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• NECHIFOR GHEORGHE,  
ALEEA SLĂȚIOARA NR.4, BL.C2, SC.2,  
ET.1, AP.19, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,  
RO;

• RADU GABRIEL LUCIAN,  
ALEEA ROTUNDĂ NR.4, BL.H6, SC.D,  
AP.61, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• BEDA MARIANA, STR. DOAMNA GHICA  
NR.6, BL.3, SC.C, ET.7, AP.105, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• SÂRBU LILIANA, STR. VALEA OLTULUI  
NR. 16, BL. A 28, SC.C, ET. 2, AP. 37,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• NEAȚA MARIAN, SAT CHIRIACU,  
COMUNA IZVOARELE, GR, RO;  
• MIHALACHE NICOLETA,  
STR.CONSTANTIN BREZEANU NR.4,  
BL.C1, SC.A, ET.4, AP.14, PLOIEȘTI, PH,  
RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

US 5624537; I. Karube, Y. Nomura,  
*Enzyme sensors for environmental  
analysis*, J. Mol. Cat. B Enzymatic, 10  
(1-3), pp. 177-181, Tokyo, Japan, 2000

(54) **MEMBRANE POLIMERICE CONȚINÂND ENZIME  
IMOBILIZATE COVALENT PE POLIMERI IMPRENTAȚI  
MOLECULAR ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la membrane polimerice conținând enzime immobilizate covalent, pe polimeri imprentați molecular, și la procedeu de obținere a acestora, cu aplicații în biosenzori enzimatici pentru poluanți din ape. Produsul conform invenției este reprezentat de membranele polimerice care conțin enzime immobilizate covalent, caracterizate de o sensibilitate și selectivitate crescute. Procedeu conform invenției constă în prepararea unei soluții cu concentrație de 8...12% polimer și 8...10% pesticid, prin dizolvarea alcoolului polivinilic timp de 3...4 h la 70...80°C, în dimetilsulfoxid, din care se obțin membrane prin tragere pe o placă de sticlă, care sunt fie uscate la 105...115°C, timp de 45...60 min, la 20...30 mm col Hg, fie imersate

rapid în baie de coagulare conținând alcool izopropilic și dimetilsulfoxid la 105...115°C, urmând tratarea termică a membranelor timp de 5...10 min, acetalizarea timp de 15...30 min la 145...155°C, într-o baie de acetalizare, spălarea cu apă demineralizată până la neutralizare, uscarea, extragerea în metanol sau clorofom timp de 30...60 min, spălarea, apoi membranele sunt folosite ca suport pentru immobilizarea covalentă a enzimelor, prin tratarea cu o soluție de acetilcolinesterază sau tirozinază în tampon fosfat, timp de 90...150 min, la 4...22°C.

Revendicări: 6

Examinator: biochimist EREMA LAURA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

# RO 123276 B1

1 Prezenta invenție se referă la membrane polimerice conținând enzime imobilizate  
covalent pe polimeri imprentați molecular cu pesticide, cu aplicații în biosenzori enzimatici  
3 pentru poluanți din ape și la un procedeu de obținere a acestor membrane.

Unul din materialele cunoscute pentru obținerea biosenzorilor enzimatici îl reprezintă  
5 membranele polimerice conținând enzime imobilizate covalent. Astfel, **US 5624537** se referă  
la o probă de biosenzor regenerabil adaptat pentru poziționare într-un bioreactor care  
7 cuprinde, printre altele, o membrană de interfață permeabilă selectiv, care poate fi utilizată  
într-un sistem biosenzor pentru separare biochimică, optică sau alte procese, dintr-o matrice  
9 de analit care cuprinde o plasă suport, un polimer de acid perfluorosulfonic impregnat cu  
substrat și un film omogen de polimer de acid perfluorosulfonic. De asemenea, se referă și  
11 la o metodă de preparare a acestei membrane de interfață, care cuprinde stabilirea unui  
substrat pe o plasă suport pentru a forma o membrană substrat, peste care se adaugă acid  
13 perfluorosulfonic și polimer cu reticularea produsului astfel format.

Documentul *Enzyme sensors for environmental analysis*, J. Mol. Cat. B Enzymatic,  
15 2000, 10 (1-3), 177-181 I. Karube, Y. Nomura prezintă biosenzori utilizați, ocazional, pentru  
urmărirea poluanților într-un mediu acvatic cum ar fi în râu sau în ape pentru băut.  
17 Imobilizarea biomaterialelor, cum ar fi a enzimelor, este foarte importantă în fabricarea de  
biosenzori pentru verificarea mediului. Recent s-a verificat introducerea anumitor materiale  
19 de imobilizare și senzori pentru verificarea mediului, de exemplu a senzorilor fosfat.

Principiul care stă la baza biosenzorilor enzimatici îl reprezintă faptul că enzimele  
21 catalizează sau inhibă anumite reacții ale moleculelor de analit urmărit, producând semnale  
electrice, optice etc., care pot fi măsurate. Pentru aceasta este nevoie ca enzima să se afle  
23 într-o microvecinătate care să favorizeze adoptarea unei conformații optime a centrului activ  
și ca analitul să fie în concentrație suficientă în apropierea enzimei. Ultima cerință face  
25 dificilă detectarea unor poluanți, aflați în concentrații foarte mici.

Metodele cuprinse în documentele prezentate mai sus prezintă dezavantajul că nu  
27 asigură o sensibilitate și selectivitate suficiente pentru detectarea unor poluanți din ape care  
sunt foarte periculoși, chiar în concentrații foarte mici, precum anumite pesticide.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în aceea că imobilizarea enzimei  
se face pe membrane polimerice hidrofile imprentate molecular chiar cu analitul țintă, pentru  
31 a mări concentrația acestuia în vecinătatea enzimei și în același timp să asigure o  
conformație optimă centrului activ al membranei, și că în acest scop se prepară o soluție de  
33 polimer hidrofil, care este imprentat molecular prin inversie de faze cu poluantul urmărit,  
obținându-se o membrană, care ulterior este folosită ca suport pentru imobilizarea covalentă  
35 a unei enzime care catalizează sau inhibă o reacție a moleculei analitului, fiind totodată  
stabiliți parametrii diverselor faze tehnologice de obținere a noului tip de membrane  
37 polimerice imprentate molecular și conținând enzime imobilizate covalent.

Membrana polimerică, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus, prin  
39 aceea că este constituită din alcool polivinilic cu grad de polimerizare de 900-1700 și grad  
de hidroliză de 98,0-99,8%, conține enzime imobilizate covalent și este imprentată molecular  
41 cu pesticide.

Procedeu conform invenției înlătură dezavantajele procedurilor menționate anterior  
43 prin aceea că se dizolvă alcoolul polivinilic cu grad de polimerizare de 900..1700 și grad de  
hidroliză de 98,0..99,8% în dimetilsulfoxid timp de 3..4 h, la 70...80°C, pentru a se prepara  
45 o soluție cu concentrația de 8...12% polimer și conținând 8...10% pesticid, care se transformă  
în membrane care sunt ulterior tratate termic la temperatura de 145...155°C, timp de  
47 5...10 min, după care sunt acetalizate prin tratare la temperatura de 70...80°C, timp de  
15...30 min într-o baie de acetalizare conținând 100...200 g/l sulfat de sodiu decahidrat,

# RO 123276 B1

18...25 g/l acid sulfuric concentrat și 80...120 g/l glutardialdehidă, raportul de flotă între cantitatea de membrană și baia de acetalizare fiind de 1:150...1:250, membranele sunt apoi spălate cu apă demineralizată până la pH neutru, uscate timp de 10...15 min la temperatura de 105...115°C, extrase într-un solvent al pesticidului timp de 30...60 min, fie prin cufundare în lichid la temperatura de 20...40°C, fie prin extracție la fierbere în aparat Soxhlet, după care membranele se spală intens cu apă demineralizată și în unele cazuri se usucă la temperatura camerei, membranele impregnate molecular cu pesticid fiind apoi folosite ca suport pentru imobilizarea covalentă a enzimelor, prin tratarea cu o soluție 0,1 g/l de enzimă în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, timp de 90-150 min la temperatura de 4-22°C, raportul de flotă între membrană și soluția de enzimă fiind de 1:100...1:200.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- utilizează materii prime care se produc industrial, ceea ce asigură costuri de fabricație reduse;

- permite obținerea de biosenzori pentru decelarea poluanților aflați în cantități foarte mici;

- permite decelarea selectivă a poluanților, datorită selectivității polimerilor impregnați molecular;

- permite o funcționare optimă a biosenzorului, datorită faptului că se utilizează un polimer hidrofil, ceea ce asigură un microenvironment favorabil pentru centrul activ al enzimei.

Se dau în continuare 12 exemple de realizare a invenției.

**Exemplul 1.** Într-un balon de 250 ml, cu două gâturi, se introduc 62,2 ml DMSO și balonul se introduce într-o baie de apă termostată, cu temperatura de 70°C. După circa 5 min, timp suficient pentru ca lichidul să ajungă la temperatura băii, se introduc în balon 8,56 g APV cu gradul de polimerizare 900 și gradul de hidroliză 98,0%. La gâtul central al balonului se montează un agitator cu palete și se pornește agitarea. După 2 h de dizolvare se introduc în balon prin gâtul lateral 7,8 ml soluție 10% atrazină în DMSO, și se continuă agitarea încă 1 h. Se obține astfel o soluție de APV în DMSO cu concentrația de 10% polimer și conținând 10% atrazină față de polimer. Se scoate balonul cu soluția și se lasă să se răcească în aer până la temperatura camerei. Se toarnă puțină soluție pe o placă de sticlă cu dimensiunile: 200x200x4 mm și soluția se întinde cu un cuțit cu fanta de 200 μm, pentru a forma o peliculă continuă de lichid. Placa cu pelicula de lichid se introduce într-o etuvă de vid având temperatura de 115°C, unde se lasă timp de 45 min, la o presiune remanentă de 20 mm col. Hg, pentru formarea prin evaporarea solventului a unei membrane, după care membrana se introduce într-o etuvă cu circulație de aer, având temperatura de 145°C, unde se lasă timp de 10 min, pentru stabilizarea structurii. Placa cu membrana este apoi introdusă într-o baie de acetalizare conținând 100 g/L sulfat de sodiu decahidrat, 18 g/L acid sulfuric concentrat și 120 g/L glutardialdehidă, raportul de flotă între cantitatea de membrană și baia de acetalizare fiind de 1:150, unde se lasă timp de 15 min la temperatura de 80°C, membrana este apoi spălată cu apă demineralizată, până la pH neutru, uscată timp de 15 min la temperatura de 105°C, extrasă în metanol, timp de 60 min, prin cufundare în lichid la temperatura de 40°C, după care membrana se spală intens cu apă demineralizată. Membrana se lasă să se scurgă puțin și apoi în stare umedă este introdusă într-o soluție 0,1 g/L de acetilcolinesterază în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, unde este lăsată timp de 90 min la temperatura de 22°C, raportul de flotă între membrana și soluția de enzimă fiind de 1:100. Membrana obținută conține 11, 81% enzima. Măsurând activitatea enzimei imobilizate, față de enzima liberă, prin metoda spectrofotometrică cu DTNB (ditiobisnitrobenzoat) la 412 nm (*A biochemical Assay for Acetylcholinesterase Activity in PC12 Cell, Sci.*

# RO 123276 B1

1 STKE, 2007, 394, p. tr2P. J. Schwartz, J. A. Blundon, E. M. Adler) s-a constatat că activi-  
tatea enzimei imobilizate reprezintă 28,2% din cea a enzimei libere și ca după 3 incubări  
3 succesive activitatea enzimei imobilizate scade la 82,6% din cea din prima incubare, ceea  
ce dovedește caracterul covalent al imobilizării.

5 **Exemplul 2.** Într-un balon de 250 ml, cu două gături, se introduc 62,2 mL DMSO și  
balonul se introduce într-o baie de apă termostatăă, cu temperatura de 80°C. După circa  
7 5 min, timp suficient pentru ca lichidul să ajungă la temperatura băii, se introduc în balon  
8,56 g APV cu gradul de polimerizare 1700 și gradul de hidroliză 99,2%. La gâtul central al  
9 balonului se montează un agitator cu palete și se pornește agitarea. După 3 h de dizolvare  
se introduc în balon prin gâtul lateral 7,8 ml soluție 10% atrazină în DMSO, și se continuă  
11 agitarea încă 1 h. Se obține astfel o soluție de APV în DMSO cu concentrația de 10% polimer  
și conținând 10% atrazină față de polimer. Se scoate balonul cu soluția și se lasă să se  
13 răcească în aer până la temperatura camerei. Se toarnă puțină soluție pe o placă de sticlă  
cu dimensiunile: 200x200x4 mm și soluția se întinde cu un cuțit cu fanta de 200 μm, pentru  
15 a forma o peliculă continuă de lichid. Placa cu pelicula de lichid se introduce rapid într-o baie  
de coagulare conținând 60% alcool izopropilic și 40% DMSO, la temperatura camerei, unde  
17 se lasă timp de 45 min pentru formarea prin inversie de fază a unei membrane, după care  
membrana se introduce într-o etuvă cu circulație de aer, având temperatura de 105°C, unde  
19 se lasă timp de 15 min, pentru uscare și apoi membrana se introduce în altă etuvă cu  
circulație de aer, având temperatura de 155°C, timp de 5 min pentru stabilizarea structurii.  
21 Membrana este apoi introdusă într-o baie de acetalizare conținând 200 g/l sulfat de sodiu  
decahidrat, 25 g/L acid sulfuric concentrat și 80 g/L glutardialdehidă, raportul de flotă între  
23 cantitatea de membrană și baia de acetalizare fiind de 1:250, unde se lasă timp de 30 min  
la temperatura de 70°C, membrana fiind apoi spălată cu apă demineralizată, până la pH  
25 neutru, uscată timp de 10 min la temperatura de 115°C, extrasă în metanol, timp de 30 min  
în aparat Soxhlet, la fierbere, după care membrana se spală intens cu apă demineralizată.  
27 Membrana se lasă să se usuce la temperatura camerei și apoi este introdusă într-o soluție  
0,1 g/L de acetilcolinesterază în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, unde este lăsată timp de  
29 150 min la temperatura de 4°C (în frigider), raportul de flotă între membrană și soluția de  
enzimă fiind de 1:200. Membrana obținută conține 11,26% enzimă. Măsurând activitatea  
31 enzimei imobilizate, față de enzima liberă, prin metoda spectrofotometrică cu DTNB  
(ditiobisnitrobenzoat) la 412 nm, s-a constatat că activitatea enzimei imobilizate reprezintă  
33 32,7% din cea a enzimei libere și ca după 3 incubări succesive activitatea enzimei imobilizate  
scade la 84,3% din cea din prima incubare, ceea ce dovedește caracterul covalent al  
35 imobilizării.

37 **Exemplul 3.** Într-un balon de 250 ml, cu două gături, se introduc 64,9 mL DMSO și  
balonul se introduce într-o baie de apă termostatăă, cu temperatura de 80°C După circa  
39 5 min, timp suficient pentru ca lichidul să ajungă la temperatura băii, se introduc în balon  
6,80 g APV cu gradul de polimerizare 1500 și gradul de hidroliză 98,8%. La gâtul central al  
balonului se montează un agitator cu palete și se pornește agitarea. După 2,5 h de dizolvare  
41 se introduc în balon prin gâtul lateral 6,2 ml soluție 10% atrazină în DMSO, și se continuă  
agitarea încă 1 h. Se obține astfel o soluție de APV în DMSO cu concentrația de 8% polimer  
43 și conținând 10% atrazină față de polimer. Se scoate balonul cu soluția și se lasă să se  
răcească în aer până la temperatura camerei. Se toarnă puțină soluție pe o placă de sticlă  
45 cu dimensiunile: 200x200x4 mm și soluția se întinde cu un cuțit cu fanta de 300 μm, pentru  
a forma o peliculă continuă de lichid. Placa cu pelicula de lichid se introduce într-o etuvă de  
47 vid având temperatura de 105°C, unde se lasă timp de 60 min, la o presiune remanentă de  
30 mm col. Hg, pentru formarea prin evaporarea solventului a unei membrane, după care

# RO 123276 B1

membrana se introduce într-o etuvă cu circulație de aer, având temperatura de 150°C, unde se lasă timp de 8 min, pentru stabilizarea structurii. Placa cu membrana este apoi introdusă într-o baie de acetalizare conținând 150g/L sulfat de sodiu decahidrat, 22 g/L acid sulfuric concentrat și 100 g/L glutardialdehidă, raportul de flotă între cantitatea de membrană și baia de acetalizare fiind de 1:250, unde se lasă timp de 30 min la temperatura de 70°C, membrana este apoi spălată cu apă demineralizată, până la pH neutru, uscată timp de 15 min la temperatura de 105°C, extrasă în cloroform, timp de 60 min în la 20°C, după care membrana se spală intens cu apă demineralizată. Membrana se lasă se se scurgă puțin și apoi în stare umedă este introdusă într-o soluție 0,1 g/L de acetilcolinesterază în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, timp de 90 min la temperatura de 22°C, raportul de flotă între membrana și soluția de enzimă fiind de 1:150. Membrana obținută conține 10,86% enzima. Măsurând activitatea enzimei imobilizate, față de enzima liberă, prin metoda spectrofotometrică cu DTNB (ditiobisnitrobenzoat) la 412 nm, s-a constatat că activitatea enzimei imobilizate reprezintă 30,7% din cea a enzimei libere și că după 3 incubări succesive activitatea enzimei imobilizate scade la 87,4% din cea din prima incubare, ceea ce dovedește caracterul covalent al imobilizării.

**Exemplul 4.** Într-un balon de 250 ml, cu două gături, se introduc 60,6 ml DMSO și balonul se introduce într-o baie de apă termostată, cu temperatura de 80°C. După circa 5 min, timp suficient pentru ca lichidul să ajungă la temperatura băii, se introduc în balon 10,2 g APV cu gradul de polimerizare 1200 și gradul de hidroliză 99,8%. La gâtul central al balonului se montează un agitator cu palete și se pornește agitarea. După 3 h de dizolvare se introduc în balon prin gâtul lateral 7,4 ml soluție 10% atrazină în DMSO, și se continuă agitarea încă 1 h. Se obține astfel o soluție de APV în DMSO cu concentrația de 12% polimer și conținând 8% atrazină față de polimer. Se scoate balonul cu soluția și se lasă să se răcească în aer până la temperatura camerei. Se toarnă puțină soluție pe o placă de sticlă cu dimensiunile: 200x200x4 mm și soluția se întinde cu un cuțit cu fanta de 150 μm, pentru a forma o peliculă continuă de lichid. Placa cu pelicula de lichid se introduce rapid într-o baie de coagulare conținând 100% alcool izopropilic, la temperatura camerei, unde se lasă timp de 30 min pentru formarea prin inversie de fază a unei membrane, după care membrana se introduce într-o etuvă cu circulație de aer, având temperatura de 115°C, unde se lasă timp de 10 min, pentru uscare și apoi membrana se introduce în altă etuvă cu circulație de aer, având temperatura de 145°C, timp de 10 min pentru stabilizarea structurii. Membrana este apoi introdusă într-o baie de acetalizare conținând 100 g/L sulfat de sodiu decahidrat, 18 g/L acid sulfuric concentrat și 120 g/L glutardialdehidă, raportul de flotă între cantitatea de membrană și baia de acetalizare fiind de 1:250, unde se lasă timp de 15 min la temperatura de 80°C, membrana fiind apoi spălată cu apă demineralizată, până la pH neutru, uscată timp de 15 min la temperatura de 105°C, extrasă în cloroform, timp de 30 min în aparat Soxhlet la fierbere, după care membrana se spală intens cu apă demineralizată. Membrana se lasă să se scurgă de excesul de apă, la temperatura camerei, și apoi este introdusă, umedă, într-o soluție 0,1 g/L de acetilcolinesterază în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, unde este lăsată timp de 90 min la temperatura de 22°C, raportul de flotă între membrană și soluția de enzimă fiind de 1:100. Membrana obținută conține 10,67% enzimă. Măsurând activitatea enzimei imobilizate, față de enzima liberă, prin metoda spectrofotometrică cu DTNB (ditiobisnitrobenzoat) la 412 nm, s-a constatat că activitatea enzimei imobilizate reprezintă 25,6% din cea a enzimei libere și că după 3 incubări succesive activitatea enzimei imobilizate scade la 85,7% din cea din prima incubare, ceea ce dovedește caracterul covalent al imobilizării.

# RO 123276 B1

1           **Exemplul 5.** Într-un balon de 250 ml, cu două găhuri, se introduc 60,6 ml DMSO și  
balonul se introduce într-o baie de apă termostată, cu temperatura de 80°C. După circa  
3 5 min, timp suficient pentru ca lichidul să ajungă la temperatura băii, se introduc în balon  
10,2 g APV cu gradul de polimerizare 900 și gradul de hidroliză 98,0%. La gâtul central al  
5 balonului se montează un agitator cu palete și se pornește agitarea. După 3 h de dizolvare  
se introduc în balon prin gâtul lateral 7,4 ml soluție 10% atrazină în DMSO, și se continuă  
7 agitarea încă 1 h. Se obține astfel o soluție de APV în DMSO cu concentrația de 12% polimer  
și conținând 8% atrazină față de polimer. Se scoate balonul cu soluția și se lasă să se  
9 răcească în aer până la temperatura camerei. Se toarnă puțină soluție pe o placă de sticlă  
cu dimensiunile: 200x200x4 mm și soluția se întinde cu un cuțit cu fanta de 250 μm, pentru  
11 a forma o peliculă continuă de lichid. Placa cu pelicula de lichid se introduce într-o etuvă de  
vid având temperatura de 105°C, unde se lasă timp de 60 min, la o presiune remanentă de  
13 20 mm col. Hg, pentru formarea prin evaporarea solventului a unei membrane, după care  
membrana se introduce într-o etuvă cu circulație de aer, având temperatura de 155°C, unde  
15 se lasă timp de 5 min, pentru stabilizarea structurii. Placa cu membrana este apoi introdusa  
într-o baie de acetalizare conținând 200 g/L sulfat de sodiu decahidrat, 25 g/L acid sulfuric  
17 concentrat și 80 g/L glutardialdehidă, raportul de flotă între cantitatea de membrană și baia  
de acetalizare fiind de 1:250, unde se lasă timp de 30 min la temperatura de 70°C,  
19 membrana este apoi spălată cu apă demineralizată, până la pH neutru, uscată timp de  
10 min la temperatura de 115°C, extrasă în cloroform, timp de 60 min prin cufundare în lichid  
21 la temperatura de 20°C, după care membrana se spală intens cu apă demineralizată.  
Membrana se usucă la temperatura camerei, după care este introdusă într-o soluție 0,1 g/L  
23 de tirozinaza în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, unde este lăsată timp de 120 min la tempe-  
ratura de 4°C, raportul de flotă între membrana și soluția de enzimă fiind de 1:200.  
25 Membrana obținută conține 12,23% enzima. Măsurând activitatea enzimei imobilizate, față  
de enzima liberă, prin metoda spectrofotometrică cu catecol la 410 nm (*Characterization of*  
27 *tyrosinase from the cap flash of Portabella mushrooms*, J. Agric. Food Chem. 47, 374-378,  
X. Zhang, J. van Leeuwen, H. J. Wichers, W. H. Flurkey) s-a constatat că activitatea enzimei  
29 imobilizate reprezintă 27,4% din cea a enzimei libere și că după 3 incubări succesive activi-  
tatea enzimei imobilizate scade la 87,8% din cea din prima incubare, ceea ce dovedește  
31 caracterul covalent al imobilizării.

**Exemplul 6.** Într-un balon de 250 ml, cu două găhuri, se introduc 64,9 ml DMSO și  
33 balonul se introduce într-o baie de apă termostată, cu temperatura de 80°C. După circa  
5 min, timp suficient pentru ca lichidul să ajungă la temperatura băii, se introduc în balon  
35 6,80 g APV cu gradul de polimerizare 1500 și gradul de hidroliză 98,8%. La gâtul central al  
balonului se montează un agitator cu palete și se pornește agitarea. După 2,5 h de dizolvare  
37 se introduc în balon prin gâtul lateral 6,2 ml soluție 10% atrazină în DMSO, și se continuă  
agitarea încă 1 h. Se obține astfel o soluție de APV în DMSO cu concentrația de 8% polimer  
39 și conținând 10% atrazină față de polimer. Se scoate balonul cu soluția și se lasă să se  
răcească în aer până la temperatura camerei. Se toarnă puțină soluție pe o placă de sticlă  
41 cu dimensiunile: 200x200x4 mm și soluția se întinde cu un cuțit cu fanta de 300 μm, pentru  
a forma o peliculă continuă de lichid. Placa cu pelicula de lichid se introduce rapid într-o baie  
43 de coagulare conținând 100% alcool izopropilic, la temperatura camerei, unde se lasă timp  
de 30 min pentru formarea prin inversie de fază a unei membrane, după care membrana se  
45 introduce într-o etuvă cu circulație de aer, având temperatura de 145°C, unde se lasă timp  
de 10 min, pentru stabilizarea structurii. Placa cu membrana este apoi introdusă într-o baie  
47 de acetalizare conținând 100 g/L sulfat de sodiu decahidrat, 18 g/L acid sulfuric concentrat  
și 120 g/L glutardialdehidă, raportul de flotă între cantitatea de membrană și baia de

# RO 123276 B1

acetalizare fiind de 1:150, unde se lasă timp de 15 min la temperatura de 80°C, membrana este apoi spălată cu apă demineralizată, până la pH neutru, uscată timp de 15 min la temperatura de 105°C, extrasă în cloroform, timp de 30 min în aparat Soxhlet la fierbere, după care membrana se spală intens cu apă demineralizată. Membrana se lasă să se scurgă de excesul de lichid și apoi în stare umedă este introdusă într-o soluție 0,1 g/L de tirozinază în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, timp de 90 min la temperatura de 22°C, raportul de flotă între membrană și soluția de enzimă fiind de 1:150. Membrana obținută conține 11,83% enzimă. Măsurând activitatea enzimei imobilizate, față de enzima liberă, prin metoda spectrofotometrică cu catecol la 410 nm (*Characterization of tyrosinase from the cap flash of Portabella mushrooms*, J. Agric. Food Chem. 47, 374-378, X. Zhang, J. van Leeuwen, H.J. Wichers, W. H. Flurkey), s-a constatat că activitatea enzimei imobilizate reprezintă 30,6% din cea a enzimei libere și că după 3 incubări succesive activitatea enzimei imobilizate scade la 83,4% din cea din prima incubare, ceea ce dovedește caracterul covalent al imobilizării.

**Exemplul 7.** Într-un balon de 250 ml, cu două gâturi, se introduc 60,6 ml DMSO și balonul se introduce într-o baie de apă termostată, cu temperatura de 80°C. După circa 5 min, timp suficient pentru ca lichidul să ajungă la temperatura băii, se introduc în balon 10,2 g APV cu gradul de polimerizare 1200 și gradul de hidroliză 99,3%. La gâtul central al balonului se montează un agitator cu palete și se pornește agitarea. După 3 h de dizolvare se introduc în balon prin gâtul lateral 7,4 ml soluție 10% simazină în DMSO, și se continuă agitarea încă 1 h. Se obține astfel o soluție de APV în DMSO cu concentrația de 12% polimer și conținând 8% simazina față de polimer. Se scoate balonul cu soluția și se lasă să se răcească în aer până la temperatura camerei. Se toarnă puțină soluție pe o placă de sticlă cu dimensiunile: 200x200x4 mm și soluția se întinde cu un cuțit cu fanta de 150 μm, pentru a forma o peliculă continuă de lichid. Placa cu pelicula de lichid se introduce rapid într-o baie de coagulare conținând 60% alcool izopropilic și 40% DMSO, la temperatura camerei, unde se lasă timp de 45 min pentru formarea prin inversie de fază a unei membrane, după care membrana se introduce într-o etuvă cu circulație de aer, având temperatura de 115°C, unde se lasă timp de 10 min, pentru uscare și apoi membrana se introduce în alta etuvă cu circulație de aer, având temperatura de 145°C, timp de 10 min pentru stabilizarea structurii. Membrana este apoi introdusă într-o baie de acetalizare conținând 200 g/L sulfat de sodiu decahidrat, 18 g/L acid sulfuric concentrat și 120 g/L glutardialdehidă, raportul de flotă între cantitatea de membrană și baia de acetalizare fiind de 1:150, unde se lasă timp de 15 min la temperatura de 80°C, membrana fiind apoi spălată cu apă demineralizată, până la pH neutru, uscată timp de 15 min la temperatura de 105°C, extrasă în cloroform, timp de 30 min în aparat Soxhlet la fierbere, după care membrana se spală intens cu apă demineralizată. Membrana se lasă să se usuce la temperatura camerei și apoi este introdusă într-o soluție 0,1 g/L de acetilcolinesteraza în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, unde este lăsată timp de 150 min la temperatura de 4°C (în frigider), raportul de flotă între membrana și soluția de enzimă fiind de 1:200. Membrana obținută conține 11,43% enzima. Măsurând activitatea enzimei imobilizate, față de enzima liberă, prin metoda spectrofotometrică cu DTNB (ditiobisnitrobenzoat) la 412 nm, s-a constatat că activitatea enzimei imobilizate reprezintă 29,8% din cea a enzimei libere și că după 3 incubări succesive activitatea enzimei imobilizate scade la 83,9% din cea din prima incubare, ceea ce dovedește caracterul covalent al imobilizării.

**Exemplul 8.** Într-un balon de 250 ml, cu două gâturi, se introduc 64,9 ml DMSO și balonul se introduce într-o baie de apă termostată, cu temperatura de 70°C. După circa 5 min, timp suficient pentru ca lichidul să ajungă la temperatura băii, se introduc în balon 6,80 g APV cu gradul de polimerizare 1700 și gradul de hidroliză 99,2%. La gâtul central al balonului se montează un agitator cu palete și se pornește agitarea. După 2,5 h de dizolvare

# RO 123276 B1

1 se introduc în balon prin gâtul lateral 6,2 ml soluție 10% simazină în DMSO, și se continuă  
2 agitarea încă 1 h. Se obține astfel o soluție de APV în DMSO cu concentrația de 8% polimer  
3 și conținând 10% simazină față de polimer. Se scoate balonul cu soluția și se lasă să se  
4 răcească în aer până la temperatura camerei. Se toarnă puțină soluție pe o placă de sticlă  
5 cu dimensiunile: 200x200x4 mm și soluția se întinde cu un cuțit cu fanta de 250 μm, pentru  
6 a forma o peliculă continuă de lichid. Placa cu pelicula de lichid se introduce într-o etuvă de  
7 vid având temperatura de 105°C, unde se lasă timp de 60 min, la o presiune remanentă de  
8 20 mm col. Hg, pentru formarea prin evaporarea solventului a unei membrane, după care  
9 membrana se introduce într-o etuvă cu circulație de aer, având temperatura de 155°C, unde  
10 se lasă timp de 5 min, pentru stabilizarea structurii. Membrana este apoi introdusă într-o baie  
11 de acetalizare conținând 200 g/L sulfat de sodiu decahidrat, 25 g/L acid sulfuric concentrat  
12 și 80 g/L glutardialdehidă, raportul de flotă între cantitatea de membrană și baia de  
13 acetalizare fiind de 1:250, unde se lasă timp de 30 min la temperatura de 80°C, membrana  
14 fiind apoi spălată cu apă demineralizată, până la pH neutru, uscată timp de 10 min la  
15 temperatura de 115°C, extrasă în cloroform, timp de 60 min, prin cufundare în lichid, la 40°C,  
16 după care membrana se spală intens cu apă demineralizată. Membrana se lasă să se scurgă  
17 de excesul de apă la temperatura camerei și apoi este introdusă într-o soluție 0,1 g/L de  
18 acetilcolinesterază în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, unde este lăsată timp de 90 min la  
19 temperatura de 22°C, raportul de flotă între membrană și soluția de enzimă fiind de 1:100.  
20 Membrana obținută conține 10,49% enzimă. Măsurând activitatea enzimei imobilizate, față  
21 de enzima liberă, prin metoda spectrofotometrică cu DTNB (ditiobisnitrobenzoat) la 412 nm,  
22 s-a constatat că activitatea enzimei imobilizate reprezintă 29,8% din cea a enzimei libere și  
23 că după 3 incubări succesive, activitatea enzimei imobilizate scade la 88,3% din cea din  
24 prima incubare, ceea ce dovedește caracterul covalent al imobilizării.

25 **Exemplul 9.** Într-un balon de 250 ml, cu două gâturi, se introduc 60,6 ml DMSO și  
26 balonul se introduce într-o baie de apă termostatăă, cu temperatura de 80°C. După circa  
27 5 min, timp suficient pentru ca lichidul să ajungă la temperatura băii, se introduc în balon  
28 10,2 g APV cu gradul de polimerizare 900 și gradul de hidroliză 98,0%. La gâtul central al  
29 balonului se montează un agitator cu palete și se pornește agitarea. După 3 h de dizolvare  
30 se introduc în balon prin gâtul lateral 7,4 ml soluție 10% simazina în DMSO, și se continuă  
31 agitarea încă 1 h. Se obține astfel o soluție de APV în DMSO cu concentrația de 12% polimer  
32 și conținând 8% simazina față de polimer. Se scoate balonul cu soluția și se lasă să se  
33 răcească în aer până la temperatura camerei. Se toarnă puțină soluție pe o placă de sticlă  
34 cu dimensiunile: 200x200x4 mm și soluția se întinde cu un cuțit cu fanta de 150 μm, pentru  
35 a forma o peliculă continuă de lichid. Placa cu pelicula de lichid se introduce rapid într-o baie  
36 de coagulare conținând 60% alcool izopropilic și 40% DMSO, la temperatura camerei, unde  
37 se lasă timp de 45 min pentru formarea prin inversie de fază a unei membrane, după care  
38 membrana se introduce într-o etuvă cu circulație de aer, având temperatura de 115°C, unde  
39 se lasă timp de 10 min, pentru uscare și apoi membrana se introduce în altă etuvă cu  
40 circulație de aer, având temperatura de 145°C, timp de 10 min pentru stabilizarea structurii.  
41 Membrana este apoi introdusă într-o baie de acetalizare conținând 200 g/L sulfat de sodiu  
42 decahidrat, 18 g/L acid sulfuric concentrat și 120 g/L glutardialdehidă, raportul de flotă între  
43 cantitatea de membrană și baia de acetalizare fiind de 1:150, unde se lasă timp de 15 min  
44 la temperatura de 80°C, membrana fiind apoi spălată cu apă demineralizată, până la pH  
45 neutru, uscată timp de 15 min la temperatura de 105°C, extrasă în metanol, timp de 60 min  
46 în aparat Soxhlet la fierbere, după care membrana se spală intens cu apă demineralizată.  
47 Membrana se lasă să se usuce la temperatura camerei și apoi este introdusă într-o soluție  
0,1 g/L de acetilcolinesterază în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, unde este lăsată timp de



# RO 123276 B1

150 min la temperatura de 4°C (în frigider), raportul de flotă între membrană și soluția de 1  
enzimă fiind de 1:200. Membrana obținută conține 10,73% enzimă. Măsurând activitatea 1  
enzimei imobilizate, față de enzima liberă, prin metoda spectrofotometrică cu DTNB 3  
(ditiobisnitrobenzoat) la 412 nm, s-a constatat că activitatea enzimei imobilizate reprezintă 5  
28,8% din cea a enzimei libere și că după 3 incubări succesive activitatea enzimei imobilizate  
scade la 86,2% din cea din prima incubare, ceea ce dovedește caracterul covalent al 7  
imobilizării.

**Exemplul 10.** Într-un balon de 250 ml, cu două gâturi, se introduc 64,9 ml DMSO și 9  
balonul se introduce într-o baie de apă termostată, cu temperatura de 70°C. După circa 9  
5 min, timp suficient pentru ca lichidul să ajungă la temperatura băii, se introduc în balon  
6,80 g APV cu gradul de polimerizare 1700 și gradul de hidroliză 99,2%. La gâtul central al 11  
balonului se montează un agitator cu palete și se pornește agitarea. După 2,5 h de dizolvare  
se introduc în balon prin gâtul lateral 6,2 ml soluție 10% simazină în DMSO, și se continuă 13  
agitarea încă 1 h. Se obține astfel o soluție de APV în DMSO cu concentrația de 8% polimer  
și conținând 10% simazină față de polimer. Se scoate balonul cu soluția și se lasă să se 15  
răcească în aer până la temperatura camerei. Se toarnă puțină soluție pe o placă de sticlă  
cu dimensiunile: 200x200x4 mm și soluția se întinde cu un cuțit cu fanta de 250 μm, pentru 17  
a forma o peliculă continuă de lichid. Placa cu pelicula de lichid se introduce într-o etuvă de  
vid având temperatura de 115°C, unde se lasă timp de 30 min, la o presiune remanentă de 19  
20 mm col. Hg, pentru formarea prin evaporarea solventului a unei membrane, după care  
membrana se introduce într-o etuvă cu circulație de aer, având temperatura de 155°C, unde 21  
se lasă timp de 5 min, pentru stabilizarea structurii. Membrana este apoi introdusă într-o baie  
de acetalizare conținând 200 g/L sulfat de sodiu decahidrat, 25 g/L acid sulfuric concentrat 23  
și 80 g/L glutardialdehidă, raportul de flotă între cantitatea de membrană și baia de  
acetalizare fiind de 1:250, unde se lasă timp de 30 min la temperatura de 80°C, membrana 25  
fiind apoi spălată cu apă demineralizată, până la pH neutru, uscată timp de 10 min la  
temperatura de 115°C, extrasă în metanol, timp de 60 min, prin cufundare în lichid, la 20°C, 27  
după care membrana se spală intens cu apă demineralizată. Membrana se lasă să se scurgă  
de excesul de apă la temperatura camerei și apoi este introdusă într-o soluție 0,1 g/L de 29  
tirozinază în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, unde este lăsată timp de 90 min la temperatura  
de 22°C, raportul de flotă între membrană și soluția de enzimă fiind de 1:100. Membrana 31  
obținută conține 10,49% enzima. Măsurând activitatea enzimei imobilizate, față de enzima  
liberă, prin metoda spectrofotometrică cu catecol la 410 nm, s-a constatat că activitatea 33  
enzimei imobilizate reprezintă 31,6% din cea a enzimei libere și că după 3 incubări succesive  
activitatea enzimei imobilizate scade la 82,7% din cea din prima incubare, ceea ce 35  
dovedește caracterul covalent al imobilizării.

**Exemplul 11.** Într-un balon de 250 ml, cu două gâturi, se introduc 60,6 ml DMSO și 37  
balonul se introduce într-o baie de apă termostată, cu temperatura de 80°C. După circa 39  
5 min, timp suficient pentru ca lichidul să ajungă la temperatura băii, se introduc în balon  
10,2 g APV cu gradul de polimerizare 900 și gradul de hidroliză 98,0%. La gâtul central al 41  
balonului se montează un agitator cu palete și se pornește agitarea. După 3 h de dizolvare  
se introduc în balon prin gâtul lateral 7,4 ml soluție 10% simazina în DMSO, și se continuă 43  
agitarea încă 1 h. Se obține astfel o soluție de APV în DMSO cu concentrația de 12% polimer  
și conținând 8% simazină față de polimer. Se scoate balonul cu soluția și se lasă să se 45  
răcească în aer până la temperatura camerei. Se toarnă puțină soluție pe o placă de sticlă  
cu dimensiunile: 200x200x4 mm și soluția se întinde cu un cuțit cu fanta de 150 μm, pentru 47  
a forma o peliculă continuă de lichid. Placa cu pelicula de lichid se introduce rapid într-o baie  
de coagulare conținând 60% alcool izopropilic și 40% DMSO, la temperatura camerei, unde

# RO 123276 B1

1 se lasă timp de 45 min pentru formarea prin inversie de fază a unei membrane, după care  
membrana se introduce într-o etuvă cu circulație de aer, având temperatura de 115°C, unde  
3 se lasă timp de 10 min, pentru uscare și apoi membrana se introduce în altă etuvă cu  
circulație de aer, având temperatura de 145°C, timp de 10 min pentru stabilizarea structurii.  
5 Membrana este apoi introdusă într-o baie de acetalizare conținând 200 g/L sulfat de sodiu  
decahidrat, 18 g/L acid sulfuric concentrat și 120 g/L glutardialdehidă, raportul de flotă între  
7 cantitatea de membrană și baia de acetalizare fiind de 1:150, unde se lasă timp de 15 min  
la temperatura de 80°C, membrana fiind apoi spălată cu apă demineralizată, până la pH  
9 neutru, uscată timp de 15 min la temperatura de 105°C, extrasă în cloroform, timp de 30 min  
în aparat Soxhlet la fierbere, după care membrana se spală intens cu apă demineralizată.  
11 Membrana se lasă să se usuce la temperatura camerei și apoi este introdusă într-o soluție  
0,1 g/L de tirozinaza în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, unde este lăsată timp de 150 min la  
13 temperatura de 4°C (în frigider), raportul de flotă între membrană și soluția de enzimă fiind  
de 1:200. Membrana obținută conține 10,95% enzimă. Măsurând activitatea enzimei  
15 imobilizate, față de enzima liberă, prin metoda spectrofotometrică cu catecol la 410 nm  
(*Characterization of tyrosinase from the cap flash of Portabella mushrooms*, J. Agric. Food  
17 Chem. 47, 374-378, X. Zhang, J. van Leeuwen, H. J. Wichers, W. H. Flurkey), s-a constatat  
că activitatea enzimei imobilizate reprezintă 34,2% din cea a enzimei libere și că după 3  
19 incubări succesive, activitatea enzimei imobilizate scade la 85,9% din cea din prima  
incubare, ceea ce dovedește caracterul covalent al imobilizării.

21 **Exemplul 12.** Într-un balon de 250 ml, cu două gături, se introduc 60,6 ml DMSO și  
balonul se introduce într-o baie de apă termostată, cu temperatura de 80°C. După circa  
23 5 min, timp suficient pentru ca lichidul să ajungă la temperatura băii, se introduc în balon  
10,2 g APV cu gradul de polimerizare 900 și gradul de hidroliză 98,0%. La gâtul central al  
25 balonului se montează un agitator cu palete și se pornește agitarea. După 3 h de dizolvare  
se introduc în balon prin gâtul lateral 7,4 ml soluție 10% simazina în DMSO, și se continuă  
27 agitarea încă 1 h. Se obține astfel o soluție de APV în DMSO cu concentrația de 12% polimer  
și conținând 8% simazină față de polimer. Se scoate balonul cu soluția și se lasă să se  
29 răcească în aer până la temperatura camerei. Se toarnă puțină soluție pe o placă de sticlă  
cu dimensiunile: 200x200x4 mm și soluția se întinde cu un cuțit cu fanta de 150 μm, pentru  
31 a forma o peliculă continuă de lichid. Placa cu pelicula de lichid se introduce într-o etuvă de  
vid având temperatura de 115°C, unde se lasă timp de 30 min, la o presiune remanentă de  
33 20 mm col. Hg, pentru formarea prin evaporarea solventului a unei membrane și apoi  
membrana se introduce într-o etuvă cu circulație de aer, având temperatura de 145°C, timp  
35 de 10 min pentru stabilizarea structurii. Membrana este apoi introdusă într-o baie de  
acetalizare conținând 200 g/l sulfat de sodiu decahidrat, 18 g/l acid sulfuric concentrat și  
37 120 g/l glutardialdehidă, raportul de flotă între cantitatea de membrană și baia de acetalizare  
fiind de 1:150, unde se lasă timp de 15 min la temperatura de 80°C, membrana fiind apoi  
39 spălată cu apă demineralizată, până la pH neutru, uscată timp de 15 min la temperatura de  
105°C, extrasă în cloroform, timp de 30 min, prin cufundare în lichid, la 40°C, după care  
41 membrana se spală intens cu apă demineralizată. Membrana se lasă să se usuce la  
temperatura camerei și apoi este introdusă într-o soluție 0,1 g/l de tirozinaza în tampon fosfat  
43 0,1 M cu pH 7, unde este lăsată timp de 150 min la temperatura de 4°C (în frigider), raportul  
de flotă între membrană și soluția de enzimă fiind de 1:200. Membrana obținută conține  
45 10,90% enzimă. Măsurând activitatea enzimei imobilizate, față de enzima liberă, prin metoda  
spectrofotometrică cu catecol la 410 nm (*Characterization of tyrosinase from the cap flash*  
47 *of Portabella mushrooms*, J. Agric. Food Chem. 47, 374-378, X. Zhang, J. van Leeuwen, H.  
J. Wichers, W. H. Flurkey), s-a constatat că activitatea enzimei imobilizate reprezintă 31,1%  
49 din cea a enzimei libere și că după 3 incubări succesive, activitatea enzimei imobilizate  
scade la 87,0% din cea din prima incubare, ceea ce dovedește caracterul covalent al  
51 imobilizării.

- |  |  |
|--|--|
|  | 1  |
| 1. Membrană polimerică conținând enzime imobilizate covalent pe polimeri imprentați molecular, <b>caracterizată prin aceea că</b> este constituită din alcool polivinilic cu grad de polimerizare de 900...1700 și grad de hidroliză de 98,0...99,8%, conține enzime imobilizate covalent și este imprentată molecular cu pesticide.   | 3<br>5   |
| 2. Membrană conform revendicării 1, <b>caracterizată prin aceea că</b> enzimele imobilizate covalent sunt acetilcolinesterază sau tirozinază.  | 7  |
| 3. Membrană conform revendicărilor 1 și 2, <b>caracterizată prin aceea că</b> pesticidele cu care se face imprentarea moleculară sunt atrazină sau simazină.   | 9  |
| 4. Procedeu de obținere a membranelor polimerice conținând enzime imobilizate covalent pe polimeri imprentați molecular, <b>caracterizat prin aceea că</b> se dizolvă alcoolul polivinilic cu grad de polimerizare de 900...1700 și grad de hidroliză de 98,0...99,8% și o cantitate corespunzătoare de pesticid în dimetilsulfoxid, timp de 3...4 h, la o temperatură de 70...80°C, pentru a se prepara o soluție cu concentrația de 8...12% polimer și conținând 8...10% pesticid, care se transformă în membrane, care sunt ulterior tratate termic, la 145...155°C, timp de 5...10 min, după care sunt acetalizate, prin tratare la 70...80°C, timp de 15...30 min, într-o baie de acetalizare, conținând 100...200 g/l sulfat de sodiu decahidrat, 18...25 g/l acid sulfuric concentrat și 80...120 g/l glutardialdehidă, raportul de flotă între cantitatea de membrană și baia de acetalizare fiind de 1:150...1:250, membranele sunt apoi spălate cu apă demineralizată, până la pH neutru, uscate timp de 10...15 min, la 105...115°C, extrase într-un solvent al pesticidului, timp de 30...60 min, fie prin cufundare în lichid, la 20...40°C, fie prin extracție, la fierbere, în aparat Soxhlet, după care membranele se spală intens cu apă demineralizată și în unele cazuri se usucă la temperatura camerei, membranele imprentate molecular cu pesticid fiind apoi folosite ca suport pentru imobilizarea covalentă a enzimelor, prin tratarea cu o soluție 0,1 g/l de enzimă, în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, timp de 90...150 min, la 4...22°C, raportul de flotă între membrană și soluția de enzimă fiind de 1:100...1:200. | 11<br>13<br>15<br>17<br>19<br>21<br>23<br>25<br>27 |
| 5. Procedeu conform revendicării 4, <b>caracterizat prin aceea că</b> obținerea membranelor se face prin tragere pe o placă de sticlă și fie se face uscarea directă la de 105...115°C, timp de 45...60 min, la 20...30 mm coloană de Hg, fie se face imersarea rapidă într-o baie de coagulare conținând 60...100% alcool izopropilic și restul dimetilsulfoxid, la temperatura camerei, timp de 30...45 min și apoi membrana este uscată timp de 10...15 min la 105...115°C.   | 29<br>31<br>33                                     |
| 6. Procedeu conform revendicărilor 4 și 5, <b>caracterizat prin aceea că</b> solventul pentru extracția moleculei de imprimă este metanolul sau cloroformul.   | 35   |

