



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2005 00168**

(22) Data de depozit: **24.02.2005**

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

(41) Data publicării cererii:
30.11.2006 BOPI nr. **11/2006**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,**
BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 36-40,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **SÂRBU ANDREI,** *STR. VALEA OLTULUI*
NR. 16, BL. A 28, SC. C, ET. 2, AP. 37,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• **UDREA ION,** *INTRAREA VASILE PĂUN*
NR. 5, AP. 12, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• **SÂRBU LILIANA,** *STR. VALEA OLTULUI*
NR. 16, BL. A 28, SC. C, ET. 2, AP. 37,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **BEDA MARIANA,** *STR. DOAMNA GHICA*
NR. 6, BL. 3, SC. C, ET. 7, AP. 105, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 4845035; EP 0948629 B1; EP 0687729
A1; FR 2204633; US 6066494; RO 105078

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A FIBRELOR DE ACETAT DE
CELULOZĂ CU ENZIME IMOBILIZATE COVALENT**

(57) **Rezumat:**

Invenția se referă la un procedeu de obținere a fibrelor de acetat de celuloză cu enzime imobilizate covalent, cu utilizări în bioreactoare de depolimerizare a unor polizaharide. Procedeu conform invenției constă în aceea că, inițial, fibrele se tratează cu o soluție de peroxid de benzoil în toluen, pentru crearea, pe fibre, a radicalilor liberi, urmată de adăugarea unei soluții apoase de acrilamidă și dodecilsulfat de sodiu, pentru grefarea acrilamidei pe fibre, după care grupările

amidice de pe fibre sunt activate prin tratare cu o soluție de glutaraldehidă și apoi cu o soluție de xilanază în tampon acetat de sodiu 0,2 M, cu obținerea de fibre de diacetat de celuloză, care conțin enzima imobilizată covalent, fibre care se păstrează, până la utilizare, în tampon de acetat de sodiu 0,2 M, la temperatură de circa 4°C.

Revendicări: 5



RO 123280 B1

1 Inventția se referă la un procedeu de obținere a unor fibre de acetat de celuloză cu
enzime immobilizate covalent, cu utilizări în bioreactoare de depolimerizare a unor polizaharide.

3 Unul din procedeele cunoscute de immobilizare covalentă a enzimelor constă în
tratarea membranelor de acetat de celuloză pentru a hidroliza grupele OCOCH_3 la grupe OH
5 (*Carneiro-da-Cunha M.G., Rocha J.M.S., Garcia F.A.P., Gil M.H. Lipase immobilisation on
to polymeric membranes. Biotechnology Techniques, 1999, 13, 403-409*), apoi membranele
7 sunt activate cu bromcian, după care are loc immobilizarea covalentă. Procedeu prezintă
dezavantajul ca immobilizarea covalentă are loc prea aproape de suprafața hidrofobă a poli-
9 merului, ceea ce creează o microvecinătate neprietenoasă pentru enzimă, care astfel nu-și
poate expune complet centrul activ pentru catalizarea reacțiilor care au loc în mediu apos.
11 În plus, pentru activare se folosește bromcian, un produs foarte toxic și cu risc de explozie.

Un alt procedeu cunoscut (*Gil M.H., Piedade A.P., Alegret S., Alonso J., Martinez-
13 Fabregas E., Orellana A. Covalent binding of urease on ammonium/selective potentiometric
membranes. Biosens. Bioelectron., 1992, 7(9), 645-652*) constă în oxidarea membranelor
15 de acetat de celuloză cu acid periodic, pentru a crea grupe COOH , care sunt activate cu o
carbodiimidă în vederea immobilizării covalente a enzimei. Procedeu prezintă dezavantajul
17 că, și în acest caz, enzima este immobilizată prea aproape de suprafața hidrofobă a poli-
merului, cu efecte asupra activității centrului activ al enzimei. În plus, ambele procedee pre-
19 zentate se realizează pe membrane ceea ce nu asigură suprafața maximă de contact cu
mediul în care trebuie să acționeze enzima.

21 Un alt procedeu cunoscut constă în adsorbția enzimei pe membrana de acetat de
celuloză, urmată de reticularea acesteia de membrană cu glutardialdehidă (*Wilson et al. US
23 Patent 5,165,407, 24 noiembrie 1992*). Procedeu prezintă, pe de o parte, dezavantajul
immobilizării enzimei prea aproape de suprafața hidrofobă a membranei și, pe de altă parte,
25 al unui grad redus de immobilizare a enzimei, din cauză că acetatul de celuloză conține puține
grupări OH libere și acestea sunt în marea majoritate legate la carbon secundar, deci puțin
27 reactive. În plus, immobilizarea făcută pe membrană nu asigură suprafața maximă de contact
a enzimei immobilizate cu mediul de reacție apos.

29 Un alt procedeu cunoscut constă în tratarea unor materiale polimerice hidrofobe de
diverse forme, printre care și fibre, cu o compoziție hidrofobă fotopolimerizabilă, în prezența
31 unui inițiator de fotopolimerizare, în timp ce materialul este ținut în contact cu o compoziție
fotopolimerizabilă hidrofilă (*Zhang et al. US Patent 5,889,073, 30 martie 1999*). Se obține
33 astfel un suport pe care ulterior se pot immobiliza covalent enzime. Procedeu prezintă
dezavantajul că necesită aparatură specială (cum ar fi aparatul de fotoiradiere) și că micșo-
35 rează suprafața de contact între enzima immobilizată și mediul apos de reacție, deoarece în
cursul acoperirii fibrele se pot lipi între ele.

37 Un alt procedeu cunoscut constă în utilizarea fibrelor de polifosfazenă, care sunt
tratate pentru înlocuirea catenelor laterale ale suprafeței cu grupări aminice primare, care la
39 rândul lor reacționează ulterior cu o dialdehidă, după care are loc immobilizarea covalentă a
enzimei (*Matsuki et al. US Patent 5,380,658, 10 ianuarie 1995*). Procedeu prezintă dezavan-
41 tajul că necesită utilizarea unui polimer special, de mic tonaj, cu preț de cost ridicat și inves-
tiții mari pentru sinteză și filare.

43 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în utilizarea ca suport pentru
immobilizarea enzimelor a fibrelor de acetat de celuloză și în alegerea operațiilor și condițiilor
45 de lucru, astfel încât să se mențină în mare parte caracteristicile fizico-mecanice ale fibrelor
și care să conducă, în final, la fibre cu enzime immobilizate covalent cu acțiune enzimatică în
47 depolimerizarea polizaharidelor.

RO 123280 B1

Procedeul conform invenției înlătură dezavantajele procedeelor menționate anterior prin aceea că fibrele se tratează mai întâi cu o soluție de peroxid de benzoil în toluen, apoi cu o soluție apoasă de acrilamidă și dodecilsulfat de sodiu, după care, grupările amidice formate pe fibre sunt activate prin tratarea cu o soluție de glutardialdehidă și, în final, fibrele se tratează cu o soluție de enzimă dizolvată în tampon de acetat de sodiu 0,2 M, după care, se spală cu tampon de acetat de sodiu 0,2 M, până la completa îndepărtare a enzimei necuplate, iar tratarea cu soluție de peroxid de benzoil în toluen are loc timp de 60-120 min, sub agitare lentă, la temperatura de 70-90°C, la un raport masic toluen:diacetat de celuloză de 10:1-15:1 și la un raport masic peroxid de benzoil:diacetat de celuloză de 0,5:1-0,7:1 și apoi tratarea cu soluție apoasă de acrilamidă și dodecil sulfat de sodiu are loc timp de 120-180 min, sub agitare energetică, la temperatura de 70-80°C, la un raport masic flotă apoasă:diacetat de celuloză de 100:1-200:1 și la un raportul masic acrilamidă:diacetat de celuloză de 5:1-10:1, cu concentrația de dodecilsulfat de sodiu față de acrilamidă de 1-2% gravimetric, și este urmată de spălări intense cu apă demineralizată, la temperatura de 40-50°C, la un raport de flotă: diacetat de celuloză 100:1-150:1, iar conform invenției, activarea grupărilor amidice se face prin tratarea cu o soluție apoasă 4-6% (masă/volum) de glutardialdehidă, având pH= 9,5-10,5, la un raport de flotă:diacetat de celuloză de 80:1-120:1, timp de 60-120 min la temperatura de 20°C, sub agitare lentă, fiind urmată de spălări intense cu apă demineralizată, la temperatura de 20°C, și la un raport de flotă:diacetat de celuloză de 80:1-100:1 și, tot conform invenției, tratarea fibrelor cu soluția de enzimă se face cu o soluție 0,6-0,8% (masă/volum) xilanază în tampon de acetat de sodiu 0,2 M, la un pH= 5, la un raport de flotă:diacetat de celuloză de 100:1-150:1, la temperatura de 3-5°C, timp de 120-150 min, sub o ușoară agitare, fibrele de diacetat de celuloză cu enzima astfel imobilizată covalent fiind apoi spălate la 3-5°C cu tampon de acetat de sodiu 0,2 M, la un raport de flotă:diacetat de celuloză de 80:1-100:1, sub agitare energetică.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- se asigură o suprafață de contact cu mediul de reacție mult mai mare decât în cazul imobilizării pe membrane, întrucât, datorită raportului foarte mare între lungime și diametru, fibrele prezintă cea mai mare suprafață specifică dintre toate formele de materiale polimerice. Aceasta are o mare importanță în cazul reacțiilor ce au loc în cataliza eterogenă, cum este cazul reacțiilor de depolimerizare a unor polizaharide;

- în cursul procesului de imobilizare a enzimei, suprafața specifică a fibrelor nu este afectată de procese de lipire a fibrelor;

- activitatea catalitică a enzimei este superioară, întrucât imobilizarea are loc la o distanță mai mare de suprafața hidrofobă a suportului polimeric, acest lucru fiind posibil datorită faptului că prin grefare se obțin lanțuri polimerice laterale;

- se utilizează ca suport polimeric un produs comercial mult mai ieftin decât membranele celulozice și fibrele din polimeri speciali;

- nu necesită aparatură complicată și prin urmare costurile de investiție sunt mici.

Se dau în continuare trei exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. Într-un vas de reacție, cu manta de încălzire și agitator cu palete cu turație reglabilă, cu capacitatea de 30 l, se introduc 0,1 kg fibre de diacetat de celuloză, cu finețea 1,51 den și lungimea de tăiere 12 mm, 1,5 kg toluen (circa 1,7 l) și 0,07 kg peroxid de benzoil (conținând 25% apă). Se pornește o ușoară agitare și încălzirea în manta. Amestecul este menținut la temperatura de 70°C timp de 120 min, sub o ușoară agitare. Apoi, în același vas, se adaugă 20 l soluție apoasă, preparată din 1 kg acrilamidă, 20 g dodecil sulfat de sodiu și restul apă. Amestecul este menținut la temperatura de 80°C timp de 120 min, sub o agitare energetică. După scurgerea timpului de grefare, amestecul de

RO 123280 B1

1 reacție este filtrat, pentru reținerea fibrelor grefate, care se reintroduc în același vas de
2 reacție (spălat în prealabil), unde sunt spălate sub agitare energetică cu 10 l apă deminera-
3 lizată, timp de 20 min, la temperatura de 50°C, operația fiind apoi repetată de încă 2 ori. Se
4 obțin astfel fibre de acetat de celuloză grefate, conținând 5,16 % acrilamidă, gradul de grefare
5 fiind calculat după conținutul de azot al fibrelor, determinat prin metoda Kjeldal. Fibrele
6 spălate sunt reintroduse în vasul de reacție și se adaugă 12 l soluție apoasă preparată din
7 0,96 l soluție 50% de glutardialdehidă în apă și restul apă demineralizată adusă la pH 9,5 cu
8 soluție de NaOH 10%. Fibrele grefate sunt lăsate să reacționeze cu glutaraldehidă la tem-
9 peratura camerei (20°C) timp de 60 min, sub agitare lentă. După aceea fibrele sunt reținute
10 prin filtrare și reintroduse în vasul de reacție (spălat în prealabil), unde se introduc 10 l apă
11 demineralizată pentru spălare. Spălarea se face timp de 10 min, la temperatura camerei, sub
12 agitare energetică. Apoi operația de spălare se repetă în aceleași condiții. Fibrele sunt apoi
13 reținute prin filtrare și introduse într-un vas de reacție similar cu primul, dar răcit cu sola. În
14 vasul de reacție se adaugă 15 l soluție preparată prin dizolvarea a 90 g xilanază
15 (PULPZYME) în 15 l soluție tampon acetat de sodiu 0,2 M (având pH 5). Fibrele sunt lăsate
16 să reacționeze cu enzima la temperatura de 3°C timp de 150 min, sub agitare lentă. Fibrele
17 obținute sunt reținute prin filtrare și apoi sunt reintroduse în vasul răcit cu sola (spălat în
18 prealabil cu multă apă). În vas se adaugă 10 l soluție tampon acetat de sodiu 0,2 M pentru
19 spălare. Spălarea se face la temperatura de 3°C timp de 20 min. Operația de spălare se
20 repetă în aceleași condiții. După cele două spălări, fibrele conținând enzima imobilizată sunt
21 reținute prin filtrare și introduse într-un vas în care se adaugă 10 l tampon acetat de sodiu
22 0,2 M, iar vasul, bine închis, se păstrează într-o cameră frigorifică la temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$.
23 Fibrele de acetat de celuloză modificate obținute au prezentat un conținut de xilanază de
24 9,28%, calculat din creșterea conținutului de azot față de fibrele grefate cu acrilamidă.
25 Determinarea conținutului de azot al fibrelor finale s-a făcut tot prin metoda Kjeldal. Fibrele
26 au prezentat următoarele caracteristici fizico-mecanice: Titlul: 1,67 den, Rezistența: 2,89 gf,
27 Tenacitatea: 1,73 gf/den, Alungirea la rupere: 18,2%. Fibrele obținute s-au utilizat în reacția
28 de depolimerizare a xilanului. Pentru aceasta s-a introdus o cantitate cunoscută de fibră,
29 într-o soluție cu concentrația de 1% xilan de mesteacăn în tampon acetat de sodiu 0,2 M.
30 Proba a fost lăsată să reacționeze la 50°C, timp de o oră, după care s-a determinat
31 cantitatea de zaharuri reducătoare obținută. În paralel s-a efectuat o reacție în aceleași
32 condiții, dar în loc de fibră s-a introdus cantitatea de enzimă liberă corespunzătoare celei
33 imobilizate pe fibră. S-a constatat că enzima imobilizată pe fibre prezintă 32,6% din
34 activitatea enzimei libere. După reacție, fibra a fost refolosită în alte două reacții succesive
35 de depolimerizare a xilanului de mesteacăn, efectuate în aceleași condiții, constatându-se
36 că activitatea enzimatică scade după 3 reacții la 79,8% din activitatea enzimatică inițială a
37 fibrei, ceea ce dovedește imobilizarea covalentă a enzimei pe fibrele de acetat de celuloză.

Exemplul 2. Într-un vas de reacție, cu manta de încălzire și agitator cu palete cu
38 turație reglabilă, cu capacitatea de 30 l, se introduc 0,1 kg fibre de diacetat de celuloză, cu
39 finețea 5,98 den și lungimea de tăiere 10 mm, 1 kg toluen (circa 1,15 l) și 0,05 kg peroxid de
40 benzoil (conținând 25% gravimetric apă). Se pornește o ușoară agitare și încălzirea în
41 manta. Amestecul este menținut la temperatura de 90°C timp de 60 min, sub o ușoară
42 agitare. Apoi, în același vas, se adaugă 10 l soluție apoasă, preparată din 0,5 kg acrilamidă,
43 10 g dodecil sulfat de sodiu și restul apă. Amestecul este menținut la temperatura de 70°C
44 timp de 180 min, sub o agitare energetică. După scurgerea timpului de grefare, amestecul de
45 reacție este filtrat, pentru reținerea fibrelor grefate, care se reintroduc în același vas de
46 reacție (spălat în prealabil), unde sunt spălate sub agitare energetică cu 15 l apă
47 demineralizată timp de 15 min, la temperatura de 40°C, operația fiind apoi repetată de încă

RO 123280 B1

2 ori. Se obțin astfel fibre de acetat de celuloză grefate, conținând 4,23% acrilamidă, gradul de grefare fiind calculat după conținutul de azot al fibrelor determinat prin metoda Kjeldal. Fibrele spălate sunt reintroduse în vasul de reacție și se adaugă 8 l soluție apoasă preparată din 0,96 l soluție 50% de glutaraldehidă în apă și restul apă demineralizată adusă la pH 10,5 cu soluție de NaOH 10%. Fibrele grefate sunt lăsate să reacționeze cu glutaraldehidă la temperatura camerei (20 °C) timp de 120 min, sub agitare lentă. După aceea fibrele sunt reținute prin filtrare și reintroduse în vasul de reacție (spălat în prealabil), unde se introduc 8 l apă demineralizată pentru spălare. Spălarea se face timp de 15 min, la temperatura camerei, sub agitare energetică. Apoi operația de spălare se repetă în aceleași condiții. Fibrele sunt apoi reținute prin filtrare și introduse într-un vas de reacție similar cu primul, dar răcit cu apă. În vasul de reacție, se adaugă 10 l soluție, preparată prin dizolvarea a 80 g xilanază (PULPZYME) în 10 l soluție tampon acetat de sodiu 0,2 M (având pH 5). Fibrele sunt lăsate să reacționeze cu enzima la temperatura de 5 °C timp de 120 min, sub agitare lentă. Fibrele obținute sunt reținute prin filtrare și apoi sunt reintroduse în vasul răcit cu apă (spălat în prealabil cu multă apă). În vas se adaugă 8 l soluție tampon acetat de sodiu 0,2 M pentru spălare. Spălarea se face la temperatura de 5 °C timp de 30 min. Operația de spălare se repetă în aceleași condiții. După cele două spălări, fibrele conținând enzima imobilizată sunt reținute prin filtrare și introduse într-un vas în care se adaugă 8 l tampon acetat de sodiu 0,2 M, iar vasul, bine închis, se păstrează într-o cameră frigorifică la temperatura de 4 ± 1 °C. Fibrele de acetat de celuloză modificate obținute au prezentat un conținut de xilanază de 5,40%, calculat din creșterea conținutului de azot față de fibrele grefate cu acrilamidă. Determinarea conținutului de azot al fibrelor finale s-a făcut tot prin metoda Kjeldal. Fibrele au prezentat următoarele caracteristici fizico-mecanice: Titlul: 6,34 den, Rezistența: 9,64 gf, Tenacitatea: 1,52 gf/den. Alungirea la rupere: 19,5%. Fibrele obținute s-au utilizat în reacția de depolimerizare a xilanului. Pentru aceasta s-a introdus o cantitate cunoscută de fibră într-o soluție cu concentrația de 1% xilan de mesteacăn în tampon acetat de sodiu 0,2 M. Proba a fost lăsată să reacționeze la 50 °C, timp de o oră, după care s-a determinat cantitatea de zaharuri reducătoare obținută. În paralel s-a efectuat o reacție în aceleași condiții, dar în loc de fibră s-a introdus cantitatea de enzimă liberă corespunzătoare celei imobilizate pe fibră. S-a constatat că enzima imobilizată pe fibre prezintă 47,8% din activitatea enzimei libere. După reacție, fibra a fost refolosită în alte două reacții succesive de depolimerizare a xilanului de mesteacăn, efectuate în aceleași condiții, constatându-se că activitatea enzimatică scade după 3 reacții la 82,3% din activitatea enzimatică inițială a fibrei, ceea ce dovedește imobilizarea covalentă a enzimei pe fibrele de acetat de celuloză.

Exemplul 3. Într-un vas de reacție, cu manta de încălzire și agitator cu palete cu turație reglabilă, cu capacitatea de 30 l, se introduc 0,1 kg fibre de diacetat de celuloză, cu finețea 3,23 den și lungimea de tăiere 12 mm, 1,2 kg toluen (circa 1,4 l) și 0,06 kg peroxid de benzoil (conținând 25% gravimetric apă). Se pornește o ușoară agitare și încălzirea în manta. Amestecul este menținut la temperatura de 80 °C timp de 90 min, sub o ușoară agitare. Apoi, în același vas, se adaugă 12 l soluție apoasă, preparată din 0,8 kg acrilamidă, 14 g dodecil sulfat de sodiu și restul apă. Amestecul este menținut la temperatura de 80 °C timp de 140 min, sub o agitare energetică. După scurgerea timpului de grefare, amestecul de reacție este filtrat, pentru reținerea fibrelor grefate, care se reintroduc în același vas de reacție (spălat în prealabil), unde sunt spălate sub agitare energetică cu 15 l apă demineralizată timp de 15 min, la temperatura de 40 °C, operația fiind apoi repetată de încă 2 ori. Se obțin astfel fibre de acetat de celuloză grefate, conținând 4,66% acrilamidă, gradul de grefare fiind calculat după conținutul de azot al fibrelor determinat prin metoda Kjeldal. Fibrele spălate sunt reintroduse în vasul de reacție și se adaugă 10 l soluție apoasă preparată din

RO 123280 B1

1 1 l soluție 50% de glutaraldehidă în apă și restul apă demineralizată adusă la pH 10,5 cu
3 soluție de NaOH 10%. Fibrele grefate sunt lăsate să reacționeze cu glutaraldehidă la tempe-
5 ratura camerei (20°C) timp de 100 min, sub agitare lentă. După aceea fibrele sunt reținute
7 prin filtrare și reintroduse în vasul de reacție (spălat în prealbil), unde se introduc 8 l apă
9 demineralizată pentru spălare. Spălarea se face timp de 15 min, la temperatura camerei, sub
11 agitare energetică. Apoi operația de spălare se repetă în aceleași condiții. Fibrele sunt apoi
13 reținute prin filtrare și introduse într-un vas de reacție similar cu primul, dar răcit cu sola. În
15 vasul de reacție, se adaugă 12 l soluție, preparată prin dizolvarea a 85 g xilanază
17 (PULPZYME) în 12 l soluție tampon acetat de sodiu 0,2 M (având pH 5). Fibrele sunt lăsate
19 să reacționeze cu enzima la temperatura de 4°C timp de 120 min, sub agitare lentă. Fibrele
21 obținute sunt reținute prin filtrare și apoi sunt reintroduse în vasul răcit cu sola (spălat în
23 prealabil cu multă apă). În vas se adaugă 8 l soluție tampon acetat de sodiu 0,2 M pentru
25 spălare. Spălarea se face la temperatura de 4°C timp de 30 min. Operația de spălare se
27 repetă în aceleași condiții. După cele două spălări, fibrele conținând enzima imobilizată sunt
29 reținute prin filtrare și introduse într-un vas în care se adaugă 8 l tampon acetat de sodiu
31 0,2 M, iar vasul, bine închis, se păstrează într-o cameră frigorifică la temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$.
33 Fibrele de acetat de celuloză modificate obținute au prezentat un conținut de xilanază de
6,74 %, calculat din creșterea conținutului de azot față de fibrele grefate cu acrilamidă.
Determinarea conținutului de azot al fibrelor finale s-a făcut tot prin metoda Kjeldal. Fibrele
au prezentat următoarele caracteristici fizico-mecanice: Titlul: 3,42 den, Rezistența: 5,54 gf,
Tenacitatea: 1,62 gf/den, Alungirea la rupere: 18,7%. Fibrele obținute s-au utilizat în reacția
de depolimerizare a xilanului. Pentru aceasta s-a introdus o cantitate cunoscută de fibră,
într-o suspensie cu concentrația de 1% celuloză defibrată (cu gradul mediu de polimerizare
890) în tampon acetat de sodiu 0,2 M. Proba a fost lăsată să reacționeze la 50°C, timp de
o oră, după care, suspensia de celuloză s-a filtrat și s-a determinat gradul mediu de polime-
rizare al celulozei obținute. În paralel s-a efectuat o reacție în aceleași condiții, dar în loc de
fibră s-a introdus cantitatea de enzimă liberă corespunzătoare celei imobilizate pe fibră. Prin
raportul între gradul mediu de polimerizare al celulozei inițiale și finale, s-a determinat
activitatea enzimei imobilizate și respectiv a celei libere. S-a constatat că enzima imobilizată
pe fibre prezintă 21,9% din activitatea enzimei libere. După reacție, fibra, spălată în tampon
de acetat de sodiu 0,2 M a fost refolosită în alte două reacții succesive de depolimerizare a
celulozei, efectuate în aceleași condiții, constatându-se că activitatea enzimatică scade după
3 reacții la 62,5% din activitatea enzimatică inițială a fibrei, ceea ce dovedește imobilizarea
covalentă a enzimei pe fibrele de acetat de celuloză.

1. Procedeu de obținere a fibrelor de acetat de celuloză cu enzime imobilizate covalent, **caracterizat prin aceea că** fibrele se tratează mai întâi cu o soluție de peroxid de benzoil în toluen, apoi cu o soluție apoasă de acrilamidă și dodecilsulfat de sodiu, după care, grupările amidice formate pe fibre se activează prin tratarea cu o soluție apoasă de glutardialdehidă și, în final, fibrele se tratează cu o soluție de enzimă dizolvată în tampon de acetat de sodiu 0,2 M, după care, se spală cu tampon de acetat de sodiu 0,2 M până la completa îndepărtare a enzimei necuplate.

2. Procedeu de obținere a fibrelor de acetat de celuloză cu enzime imobilizate covalent, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** tratarea cu soluție de peroxid de benzoil în toluen are loc timp de 60-120 min, sub agitare lentă, la temperatura de 70-90°C, la un raport masic toluen:diacetat de celuloză de 10:1-15:1 și la un raport masic peroxid de benzoil:diacetat de celuloză de 0,5:1-0,7:1.

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** tratarea cu soluție apoasă de acrilamidă și dodecil sulfat de sodiu are loc timp de 120-180 min, sub agitare energetică, la temperatura de 70-80°C, la un raport masic flotă apoasă:diacetat de celuloză de 100:1-200:1 și la un raport masic acrilamidă:diacetat de celuloză de 5:1-10:1, cu concentrația de dodecil sulfat de sodiu față de acrilamidă de 1-2% gravimetric, și este urmată de spălări intense cu apă demineralizată, la temperatura de 40-50°C, la un raport de flotă:diacetat de celuloză 100:1-150:1.

4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** activarea grupărilor amidice se face prin tratarea cu o soluție apoasă 4-6%, în procente de masă/volum, de glutardialdehidă, având pH = 9,5-10,5, la un raport de flotă:diacetat de celuloză de 80:1-120:1, timp de 60-120 min, la temperatura de 20°C, sub agitare lentă, fiind urmată de două spălări intense cu apă demineralizată, la temperatura de 20°C, și la un raport de flotă:diacetat de celuloză de 80:1-100:1.

5. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** tratarea fibrelor cu soluția de enzimă se face cu o soluție 0,6-0,8%, în procente de masă/volum, xilanază în tampon de acetat de sodiu 0,2 M, la un pH = 5, la un raport de flotă:diacetat de celuloză de 100:1-150:1, la temperatura de 3-5°C, timp de 120-150 min, sub o ușoară agitare, fibrele de diacetat de celuloză cu enzimă astfel imobilizată covalent fiind apoi spălate la 3-5°C cu tampon de acetat de sodiu 0,2 M, la un raport de flotă:diacetat de celuloză de 80:1-100:1, sub agitare energetică.

