



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 00288

(22) Data de depozit: 01.04.2011

(41) Data publicării cererii:
30.07.2013 BOPI nr. 7/2013

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE UMF, STR. EMIL ISAC NR.13,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• SÂRBU ANDREI, STR.VALEA OLTULUI
NR.16, BL.A 28, SC.C, ET.2, AP.37,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• SANDU TEODOR, STR. TURDA NR. 108,
BL. 33, SC. A, ET. 8, AP. 32, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• SÂNDULESCU ROBERT, STR. DONATH
NR.20, AP. 14, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• CRISTEA CECILIA,
STR. ALEXANDRU VLĂHUȚĂ NR. 21,
AP. 45, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• DIMA ȘTEFAN OVIDIU, STR. ODOBEȘTI
NR.5B, BL. M7B, SC.B, AP.72, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• UDREA ION, INTRAREA VASILE PĂUN
NR.5, ET.5, AP.12, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BRADU CORINA, STR. MĂCELARI NR. 19
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• DUMITRU ANCA AURELIA,
STR. SCHEILOR NR. 82, CODLEA, BV, RO;
• VULPE SILVIU, STR. CRIȘAN NR. 10,
BL. GA13, AP. 1, SLATINA, OT, RO;
• IOVU HORIA, STR.MARIA TÂNASE NR.3,
BL.13, SC.2, ET.4, AP.49, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• SÂRBU LILIANA, STR.VALEA OLTULUI
NR.16, BL.A 28, SC.C, ET.2, AP.37,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• BODOKI EDE, STR. MEHEDIȘI
NR. 54-56, BL.D5, AP.69, CLUJ-NAPOCA,
CJ, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A GRANULELOR DE POLIPIROL
CONȚINÂND ENZIME IMOBILIZATE COVALENT**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a granulelor polipirol conținând enzime immobilizate covalent, cu aplicații în domeniul biosenzorilor și în alte domenii biotehnologice, constând din funcționalizarea suprafeței granulelor de polipirol prin reacția grupărilor NH cu grupările CHO ale glutaraldehidei, după care are loc reacția grupărilor aldehidice nereacționate cu grupările NH₂ și COOH ale proteinei enzimatică, și, astfel, are loc immobilizarea covalentă a enzimelor. Prin această

metodă se asigură immobilizarea enzimei pe suprafața granulei și la o distanță suficientă de suprafața polimerului, ceea ce asigură disponibilitatea întregii cantități de enzimă pentru biocataliză, și o eficacitate maximă a acesteia, deoarece enzima poate să-și configureze optim centrul activ.

Revendicări: 1



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2011 00 288
Data depozit ..01..04..2011...

11

PROCEDEU DE OBTINERE A GRANULELOR DE POLIPIROL CONȚINÂND ENZIME IMOBILIZATE COVALENT

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a granulelor de polipirol conținând enzime immobilizate covalent, cu aplicații în producerea de biosenzori și în biotehnologie.

Pentru obținerea de biosenzori enzimatici se recomandă immobilizarea enzimelor pe polimeri electroconductivi, cum ar fi polipirolul. Pe de altă parte, granulele de polimeri conținând enzime immobilizate au multiple aplicații în biocataliza proceselor din biotehnologie

Se cunosc mai multe metode de immobilizare a enzimelor pe polipirol.

1. Immobilizarea enzimelor prin înglobare în filmul de polipirol sau de copolimeri grefați ai acestuia, în timpul electropolimerizării [1- 4]. Metoda are dezavantajul că o mare parte din enzimă este cuprinsă în interiorul filmului și deci nu are acces la substratul cu care trebuie să reacționeze. În plus, chiar și enzima aflată pe suprafață are o activitate catalitică redusă, deoarece suprafața hidrofobă a polimerului nu permite aranjarea centrului activ al enzimei în poziția optimă.

2. Immobilizarea covalentă a enzimelor pe filme de poli N-3 aminopropil pirol obținute prin electropolimerizare [5]. Metoda are dezavantajul că necesită prepararea unui monomer special: N-3 aminopropil pirolul, ceea ce complică mult procesul tehnologic și mărește mult prețul produselor, o mare parte din grupările aminice se află în interiorul filmului și deci nu pot fi folosite la immobilizarea enzimei iar activitatea enzimatică a enzimei immobilizate este redusă din cauza aproprierii prea mari de suprafața polimerului.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în immobilizarea covalentă a enzimelor pe granule de polipirol, prin modificarea suprafeței granulelor prin reacția polimer analogă a grupelor NH din polipirol cu grupele CHO din glutardialdehidă, urmată de immobilizarea covalentă a enzimelor prin reacția grupelor COOH și NH₂ ale proteinei enzimatică cu grupele CHO, rămase libere, ale dialdehidei legate pe suprafața polimerului, fazele tehnologice și parametrii de lucru fiind astfel aleși încât să se obțină caracteristicile compoziționale și structurale dorite ale granulelor polimerice conținând enzime, corespunzătoare domeniului de utilizare.

Procedeul conform invenției înlătură dezavantajele procedeelelor menționate anterior prin aceea că granulele de polipirol se introduc într-o baie de funcționalizare formată dintr-o soluție apoasă conținând 10-20 % (volumetric) soluție apoasă de glutardialdehidă 50% (gravimetric) și



Handwritten signature

1-2 % (volumetric) H₂SO₄ concentrat 98%, raportul între granulele de polipirol și soluția băii de funcționalizare fiind de 1:100- 1:200 (masă:volum), baia de funcționalizare având temperatura de 70-80 °C și granulele se mențin în baie, sub o agitare lentă, timp de 20-40 minute, după care suspensia de granule se lasă să se răcească în aer liber timp de 10-15 minute și se filtrează pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă, turta se spală pe filtru cu apă demineralizată în 3 reprize, fiecare repriză având o cantitate de apă aproximativ egală cu cantitatea de apă folosită la prepararea băii de funcționalizare, apoi granulele funcționalizate obținute sunt introduse într-o baie de imobilizare formată din soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7 conținând 0,3-1,0 % una din enzimele: tirozinază, peroxidaza hreanului sau xilanază, unde se mențin la temperatura camerei (20 °), sub agitare, timp 1-3 ore, raportul între granule și baia de imobilizare fiind de 1: 20- 1: 50 (masă: volum), după care suspensia obținută se filtrează pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă, turta se spală cu apă demineralizată în 3 reprize, fiecare repriză utilizând o cantitate de apă egală cu de aproximativ cinci ori cantitatea de soluție tampon folosită la prepararea băii de imobilizare, turta spalată fiind apoi trecută într-o cantitate de soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, astfel încât raportul solid: lichid să fie de 1:20- 1:30, și suspensia obținută este menținută până la utilizare într-un vas bine închis introdus în frigider, la temperatura de +4- +8 °C.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- asigură o imobilizare a enzimelor în afara structurii polimerului, ceea ce face ca eficiența utilizării enzimelor să fie foarte mare;
- enzima imobilizată se află la o distanță destul de mare de suprafața polimerului, ceea ce permite enzimei să-și aranjeze optim centrul activ și să aibă o activitate enzimatică ridicată;
- utilizează pentru funcționalizare o substanță de uz industrial, relativ ieftină, precum soluția apoasă 50% de glutardialdehidă;
- permite dirijarea activității enzimaticice a granulelor de polipirol, în funcție de gradul de funcționalizare al suprafeței granulelor și în funcție de condițiile de lucru din etapa de imobilizare covalentă;
- asigură prin legăturile covalente o imobilizare permanentă a enzimei pe polimer ceea ce evita eluția enzimei în mediul de reacție.

Se dau în continuare exemple de realizare a invenției:



Exemplul 1

Într-un balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 30 mL se prepară o soluție de baie de funcționalizare formată din 8,9 mL apă demineralizată, 1 mL soluție apoasă 50 % (gravimetric) de glutardialdehidă și 0,1 mL H₂SO₄ concentrat 98%. Peste această soluție se adaugă 0,1 g granule de polipirol și un corp magnetic teflonat. Balonul se introduce într-o baie de apă, cu temperatura menținută constantă la 80 °C (prin recirculare dintr-o altă baie de apă, ultratermostatată). Baia de apă cu balonul de 30 mL este amplasată pe un agitator magnetic și se pornește o agitare lentă. Se menține balonul în baie, sub agitare lentă timp de 40 minute. Apoi balonul se scoate din baia de apă și se lasă 10-15 minute pentru a se răci la temperatura camerei, după care suspensia din balon este filtrată pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă. Turta este spălată în 3 reprize cu apă demineralizată având temperatura camerei (20 °C). În fiecare repriză de spălare se utilizează câte 9 mL de apă, folosită în prealabil și pentru antrenarea granulelor rămase în balon. Într-un alt balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 10 mL se introduc 2 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7 și 20 mg tirozinază (*mushroom*) și un corp magnetic teflonat. Se așază paharul de 10 mL pe un agitator magnetic și se pornește agitare. Se menține balonul sub agitare la temperatura camerei (20 °C) până se dizolvă toată enzima. Apoi se reduce viteza de agitare și se adaugă turta de granule funcționalizate rezultată după filtrarea și spălarea granulelor obținute anterior în balonul de 30 mL. Se lasă totul sub agitare lentă timp de 2 ore la temperatura camerei (20 °C), după care suspensia este filtrată pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă. Turta obținută este spălată în 3 reprize cu câte 10 mL apă distilată (folosită în prealabil și la antrenarea granulelor rămase în balonul de 10 mL). După aceea, turta de granule conținând enzime immobilizate covalent este transferată într-un vas Erlenmayer cu dop rodat, de stocare, de 10 mL și se adaugă 2 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, se închide etanș vasul (cu dop și cu membrană) și se introduce în frigider la temperatura de +4 - +8 °C, unde se menține până la utilizare. Determinarea prin FTIR a intensității benzii peptidice de la cca 1650 cm⁻¹ a permis estimarea unui conținut de tirozinază de cca 8 %, care scade la cca 7 % după 3 spălări cu câte 20 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei.

Exemplul 2.

Într-un balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 30 mL se prepară o soluție de baie de funcționalizare formată din 15,6 mL apă demineralizată, 4 mL soluție apoasă 50 %



C. C.

(gravimetric) de glutardialdehidă și 0,4 mL H₂SO₄ concentrat 98%. Peste această soluție se adaugă 0,1 g granule de polipirol și un corp magnetic teflonat. Balonul se introduce într-o baie de apă, cu temperatura menținută constantă la 70 °C (prin recirculare dintr-o altă baie de apă, ultratermostată). Baia de apă cu balonul de 30 mL este amplasată pe un agitator magnetic și se pornește o agitare lentă. Se menține balonul în baie, sub agitare lentă timp de 20 minute. Apoi balonul se scoate din baia de apă și se lasă 10-15 minute pentru a se răci la temperatura camerei, după care suspensia din balon este filtrată pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă. Turta este spălată în 3 reprize cu apă demineralizată având temperatura camerei (20 °C). În fiecare repriză de spălare se utilizează câte 16 mL de apă, folosită în prealabil și pentru antrenarea granulelor rămase în balon. Într-un alt balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 10 mL se introduc 5 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7 și 25 mg tirozinază (*mushroom*) și un corp magnetic teflonat. Se așază paharul de 10 mL pe un agitator magnetic și se pornește agitare. Se menține balonul sub agitare la temperatura camerei (20 °C) până se dizolvă toată enzima. Apoi se reduce viteza de agitare și se adaugă turta de granule funcționalizate rezultată după filtrarea și spălarea granulelor obținute anterior în balonul de 30 mL. Se lasă totul sub agitare lentă timp de 1 oră la temperatura camerei (20 °C), după care suspensia este filtrată pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă. Turta obținută este spălată în 3 reprize cu câte 25 mL apă distilată (folosită în prealabil și la antrenarea granulelor rămase în balonul de 10 mL). După aceea, turta de granule conținând enzime imobilizate covalent este transferată într-un vas Erlenmayer cu dop rodat, de stocare, de 10 mL și se adaugă 3 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, se închide etanș vasul (cu dop și cu membrană) și se introduce în frigider la temperatura de +4 - +8 °C, unde se menține până la utilizare. Determinarea prin FTIR a intensității benzii peptidice de la cca 1650 cm⁻¹ a permis estimarea unui conținut de tirozinază de cca 7 %, care scade la cca 6 % după 3 spălări cu câte 20 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei.

Exemplul 3

Într-un balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 30 mL se prepară o soluție de baie de funcționalizare formată din 8,35 mL apă demineralizată, 1,50 mL soluție apoasă 50 % (gravimetric) de glutardialdehidă și 0,15 mL H₂SO₄ concentrat 98%. Peste această soluție se adaugă 0,1 g granule de polipirol și un corp magnetic teflonat. Balonul se introduce într-o baie de apă, cu temperatura menținută constantă la 75 °C (prin recirculare dintr-o altă baie de apă,



ultratermostatată). Baia de apă cu balonul de 30 mL este amplasată pe un agitator magnetic și se pornește o agitare lentă. Se menține balonul în baie, sub agitare lentă timp de 30 minute. Apoi balonul se scoate din baia de apă și se lasă 10-15 minute pentru a se răci la temperatura camerei, după care suspensia din balon este filtrată pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă. Turta este spălată în 3 reprize cu apă demineralizată având temperatura camerei (20 °C). În fiecare repriză de spălare se utilizează câte 8,5 mL de apă, folosită în prealabil și pentru antrenarea granulelor rămase în balon. Într-un alt balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 10 mL se introduc 3,35 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7 și 10 mg tirozinază (*mushroom*) și un corp magnetic teflonat. Se așază paharul de 10 mL pe un agitator magnetic și se pornește agitare. Se menține balonul sub agitare la temperatura camerei (20 °C) până se dizolvă toată enzima. Apoi se reduce viteza de agitare și se adaugă turta de granule funcționalizate rezultată după filtrarea și spălarea granulelor obținute anterior în balonul de 30 mL. Se lasă totul sub agitare lentă timp de 3 ore la temperatura camerei (20 °C), după care suspensia este filtrată pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă. Turta obținută este spălată în 3 reprize cu câte 17 mL apă distilată (folosită în prealabil și la antrenarea granulelor rămase în balonul de 10 mL). După aceea, turta de granule conținând enzime imobilizate covalent este transferată într-un vas Erlenmayer cu dop rodat, de stocare, de 10 mL și se adaugă 2,5 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, se închide etanș vasul (cu dop și cu membrană) și se introduce în frigider la temperatura de +4 - +8 °C, unde se menține până la utilizare. Determinarea prin FTIR a intensității benzii peptidice de la cca 1650 cm⁻¹ a permis estimarea unui conținut de tirozinază de cca 8 %, care scade la cca 7,5 % după 3 spălări cu câte 20 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei.

Exemplul 4

Într-un balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 30 mL se prepară o soluție de baie de funcționalizare formată din 8,9 mL apă demineralizată, 1 mL soluție apoasă 50 % (gravimetric) de glutardialdehidă și 0,1 mL H₂SO₄ concentrat 98%. Peste această soluție se adaugă 0,1 g granule de polipirol și un corp magnetic teflonat. Balonul se introduce într-o baie de apă, cu temperatura menținută constantă la 80 °C (prin recirculare dintr-o altă baie de apă, ultratermostatată). Baia de apă cu balonul de 30 mL este amplasată pe un agitator magnetic și se pornește o agitare lentă. Se menține balonul în baie, sub agitare lentă timp de 40 minute. Apoi balonul se scoate din baia de apă și se lasă 10-15 minute pentru a se răci la temperatura camerei,



C R

după care suspensia din balon este filtrată pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă. Turta este spălată în 3 reprize cu apă demineralizată având temperatura camerei (20 °C). În fiecare repriză de spălare se utilizează câte 9 mL de apă, folosită în prealabil și pentru antrenarea granulelor rămase în balon. Într-un alt balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 10 mL se introduc 2 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7 și 20 mg peroxidaza hreanului (*horse-radish*) și un corp magnetic teflonat. Se așază paharul de 10 mL pe un agitator magnetic și se pornește agitarea. Se menține balonul sub agitare la temperatura camerei (20 °C) până se dizolvă toată enzima. Apoi se reduce viteza de agitare și se adaugă turta de granule funcționalizate rezultată după filtrarea și spălarea granulelor obținute anterior în balonul de 30 mL. Se lasă totul sub agitare lentă timp de 2 ore la temperatura camerei (20 °C), după care suspensia este filtrată pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă. Turta obținută este spălată în 3 reprize cu câte 10 mL apă distilată (folosită în prealabil și la antrenarea granulelor rămase în balonul de 10 mL). După aceea, turta de granule conținând enzime imobilizate covalent este transferată într-un vas Erlenmayer cu dop rodat, de stocare, de 10 mL și se adaugă 2 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, se închide etanș vasul (cu dop și cu membrană) și se introduce în frigider la temperatura de +4 - +8 °C, unde se menține până la utilizare. Determinarea prin FTIR a intensității benzii peptidice de la cca 1650 cm⁻¹ a permis estimarea unui conținut de peroxidază de cca 9 %, care scade la cca 8 % după 3 spălări cu câte 20 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei.

Exemplul 5.

Într-un balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 30 mL se prepară o soluție de baie de funcționalizare formată din 15,6 mL apă demineralizată, 4 mL soluție apoasă 50 % (gravimetric) de glutardialdehidă și 0,4 mL H₂SO₄ concentrat 98%. Peste această soluție se adaugă 0,1 g granule de polipirol și un corp magnetic teflonat. Balonul se introduce într-o baie de apă, cu temperatura menținută constantă la 70 °C (prin recirculare dintr-o altă baie de apă, ultratermostatată). Baia de apă cu balonul de 30 mL este amplasată pe un agitator magnetic și se pornește o agitare lentă. Se menține balonul în baie, sub agitare lentă timp de 20 minute. Apoi balonul se scoate din baia de apă și se lasă 10-15 minute pentru a se răci la temperatura camerei, după care suspensia din balon este filtrată pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă. Turta este spălată în 3 reprize cu apă demineralizată având temperatura camerei (20 °C). În fiecare repriză de spălare se utilizează câte 16 mL de apă, folosită în prealabil și pentru antrenarea granulelor



rămase în balon. Într-un alt balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 10 mL se introduc 5 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7 și 25 mg peroxidaza hreanului (*horse-radish*) și un corp magnetic teflonat. Se așează paharul de 10 mL pe un agitator magnetic și se pornește agitarea. Se menține balonul sub agitare la temperatura camerei (20 °C) până se dizolvă toată enzima. Apoi se reduce viteza de agitare și se adaugă turta de granule funcționalizate rezultată după filtrarea și spălarea granulelor obținute anterior în balonul de 30 mL. Se lasă totul sub agitare lentă timp de 1 ora la temperatura camerei (20 °C), după care suspensia este filtrată pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă. Turta obținută este spălată în 3 reprize cu câte 25 mL apă distilată (folosită în prealabil și la antrenarea granulelor rămase în balonul de 10 mL). După aceea, turta de granule conținând enzime imobilizate covalent este transferată într-un vas Erlenmayer cu dop rodat, de stocare, de 10 mL și se adaugă 3 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, se închide etanș vasul (cu dop și cu membrană) și se introduce în frigider la temperatura de +4 - +8 °C, unde se menține până la utilizare. Determinarea prin FTIR a intensității benzii peptidice de la cca 1650 cm⁻¹ a permis estimarea unui conținut de peroxidază de cca 8 %, care scade la cca 7 % după 3 spălări cu câte 20 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei.

Exemplul 6

Într-un balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 30 mL se prepară o soluție de baie de funcționalizare formată din 8,35 mL apă demineralizată, 1,50 mL soluție apoasă 50 % (gravimetric) de glutardialdehidă și 0,15 mL H₂SO₄ concentrat 98%. Peste această soluție se adaugă 0,1 g granule de polipirol și un corp magnetic teflonat. Balonul se introduce într-o baie de apă, cu temperatura menținută constantă la 75 °C (prin recirculare dintr-o altă baie de apă, ultratermostată). Baia de apă cu balonul de 30 mL este amplasată pe un agitator magnetic și se pornește o agitare lentă. Se menține balonul în baie, sub agitare lentă timp de 30 minute. Apoi balonul se scoate din baia de apă și se lasă 10-15 minute pentru a se răci la temperatura camerei, după care suspensia din balon este filtrată pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă. Turta este spălată în 3 reprize cu apă demineralizată având temperatura camerei (20 °C). În fiecare repriză de spălare se utilizează câte 8,5 mL de apă, folosită în prealabil și pentru antrenarea granulelor rămase în balon. Într-un alt balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 10 mL se introduc 3,35 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7 și 10 mg peroxidaza hreanului (*horse-radish*) și un corp magnetic teflonat. Se așează paharul de 10 mL pe un agitator magnetic și se pornește agitarea. Se



C. C.

menține balonul sub agitare la temperatura camerei (20 °C) până se dizolvă toată enzima. Apoi se reduce viteza de agitare și se adaugă turta de granule funcționalizate rezultată după filtrarea și spălarea granulelor obținute anterior în balonul de 30 mL. Se lasă totul sub agitare lentă timp de 3 ore la temperatura camerei (20 °C), după care suspensia este filtrată pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă. Turta obținută este spălată în 3 reprize cu câte 17 mL apă distilată (folosită în prealabil și la antrenarea granulelor rămase în balonul de 10 mL). După aceea, turta de granule conținând enzime imobilizate covalent este transferată într-un vas Erlenmayer cu dop rodat, de stocare, de 10 mL și se adaugă 2,5 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, se închide etanș vasul (cu dop și cu membrană) și se introduce în frigider la temperatura de +4 - +8 °C, unde se menține până la utilizare. Determinarea prin FTIR a intensității benzii peptidice de la cca 1650 cm⁻¹ a permis estimarea unui conținut de peroxidază de cca 7 %, care scade la cca 6 % după 3 spălări cu câte 20 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei.

Exemplul 7.

Într-un balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 30 mL se prepară o soluție de baie de funcționalizare formată din 15,6 mL apă demineralizată, 4 mL soluție apoasă 50 % (gravimetric) de glutardialdehidă și 0,4 mL H₂SO₄ concentrat 98%. Peste această soluție se adaugă 0,1 g granule de polipirol și un corp magnetic teflonat. Balonul se introduce într-o baie de apă, cu temperatura menținută constantă la 70 °C (prin recirculare dintr-o altă baie de apă, ultratermostată). Baia de apă cu balonul de 30 mL este amplasată pe un agitator magnetic și se pornește o agitare lentă. Se menține balonul în baie, sub agitare lentă timp de 20 minute. Apoi balonul se scoate din baia de apă și se lasă 10-15 minute pentru a se răci la temperatura camerei, după care suspensia din balon este filtrată pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă. Turta este spălată în 3 reprize cu apă demineralizată având temperatura camerei (20 °C). În fiecare repriză de spălare se utilizează câte 16 mL de apă, folosită în prealabil și pentru antrenarea granulelor rămase în balon. Într-un alt balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 10 mL se introduc 5 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7 și 25 mg xilanază (*pulpzyme*) și un corp magnetic teflonat. Se așază paharul de 10 mL pe un agitator magnetic și se pornește agitare. Se menține balonul sub agitare la temperatura camerei (20 °C) până se dizolvă toată enzima. Apoi se reduce viteza de agitare și se adaugă turta de granule funcționalizate rezultată după filtrarea și spălarea granulelor obținute anterior în balonul de 30 mL. Se lasă totul sub agitare lentă timp de 1 oră la



C. V.

temperatura camerei (20 °C), după care suspensia este filtrată pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă. Turta obținută este spălată în 3 reprize cu câte 25 mL apă distilată (folosită în prealabil și la antrenarea granulelor rămase în balonul de 10 mL). După aceea, turta de granule conținând enzime imobilizate covalent este transferată într-un vas Erlenmayer cu dop rodat, de stocare, de 10 mL și se adaugă 2 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, se închide etanș vasul (cu dop și cu membrană) și se introduce în frigider la temperatura de +4- +8 °C, unde se menține până la utilizare. Determinarea prin FTIR a intensității benzii de la cca 1550 cm⁻¹ a permis estimarea unui conținut de xilanază de cca 6 %, care scade la cca 5,5 % după 3 spălări cu câte 20 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei.

Exemplul 8

Într-un balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 30 mL se prepară o soluție de baie de funcționalizare formată din 8,35 mL apă demineralizată, 1,50 mL soluție apoasă 50 % (gravimetric) de glutardialdehidă și 0,15 mL H₂SO₄ concentrat 98%. Peste această soluție se adaugă 0,1 g granule de polipirol și un corp magnetic teflonat. Balonul se introduce într-o baie de apă, cu temperatura menținută constantă la 80 °C (prin recirculare dintr-o altă baie de apă, ultratermostată). Baia de apă cu balonul de 30 mL este amplasată pe un agitator magnetic și se pornește o agitare lentă. Se menține balonul în baie, sub agitare lentă timp de 30 minute. Apoi balonul se scoate din baia de apă și se lasă 10-15 minute pentru a se răci la temperatura camerei, după care suspensia din balon este filtrată pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă. Turta este spălată în 3 reprize cu apă demineralizată având temperatura camerei (20 °C). În fiecare repriză de spălare se utilizează câte 8,5 mL de apă, folosită în prealabil și pentru antrenarea granulelor rămase în balon. Într-un alt balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 10 mL se introduc 3,35 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7 și 10 mg xilanază (*pulpzyme*) și un corp magnetic teflonat. Se așază paharul de 10 mL pe un agitator magnetic și se pornește agitare. Se menține balonul sub agitare la temperatura camerei (20 °C) până se dizolvă toată enzima. Apoi se reduce viteza de agitare și se adaugă turta de granule funcționalizate rezultată după filtrarea și spălarea granulelor obținute anterior în balonul de 30 mL. Se lasă totul sub agitare lentă timp de 3 ore la temperatura camerei (20 °C), după care suspensia este filtrată pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă. Turta obținută este spălată în 3 reprize cu câte 17 mL apă distilată (folosită în prealabil și la antrenarea granulelor rămase în balonul de 10 mL). După aceea, turta de granule conținând



C.C.

enzime imobilizate covalent este transferată într-un vas Erlenmayer cu dop rodat, de stocare, de 10 mL și se adaugă 3 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, se închide etanș vasul (cu dop și cu membrană) și se introduce în frigider la temperatura de +4 - +8 °C, unde se menține până la utilizare. Determinarea prin FTIR a intensității benzii de la cca 1550 cm⁻¹ a permis estimarea unui conținut de xilanază de cca 5 %, care scade la cca 4,5 % după 3 spălari cu câte 20 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei.

REVENDICĂRI

1.Procedeu de obținere a granulelor de polipirol conținând enzime imobilizate covalent, caracterizat prin aceea că granulele de polipirol se introduc într-o baie de funcționalizare formată dintr-o soluție apoasă conținând 10-20 % (volumetric) soluție apoasă de glutardialdehidă 50% (gravimetric) și 1-2 % (volumetric) H₂SO₄ concentrat 98%, raportul între granulele de polipirol și soluția băii de funcționalizare fiind de 1:100-1:200 (masă:volum), baia de funcționalizare având temperatura de 70-80 °C și granulele se mențin în baie, sub o agitare lentă, timp de 20-40 minute, după care suspensia de granule se lasă să se răcească în aer liber timp de 10-15 minute și se filtrează pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă, turta se spală pe filtru cu apă demineralizată în 3 reprize, fiecare repriză având o cantitate de apă aproximativ egală cu cantitatea de apă folosită la prepararea băii de funcționalizare, apoi granulele funcționalizate obținute sunt introduse într-o baie de imobilizare formată din soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7 conținând 0,3-1,0 % una din enzimele: tirozinază, peroxidaza hreanului sau xilanază, unde se mențin la temperatura camerei (20 °), sub agitare, timp 1-3 ore, raportul între granule și baia de imobilizare fiind de 1: 20- 1: 50 (masă: volum), după care suspensia obținută se filtrează pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă, turta se spală cu apă demineralizată în 3 reprize, fiecare repriză utilizând o cantitate de apă egală cu de aproximativ cinci ori cantitatea de soluție tampon folosită la prepararea băii de imobilizare, turta spălată fiind apoi trecută într-o cantitate de soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, astfel încât raportul solid: lichid să fie de 1:20-1:30, și suspensia obținută este menținută până la utilizare într-un vas bine închis introdus în frigider, la temperatura de +4 - +8 °C.



enzime immobilizate covalent este transferată într-un vas Erlenmayer cu dop rotat, de stocare, de 10 mL și se adaugă 3 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, se închide etanș vasul (cu dop și cu membrană) și se introduce în frigider la temperatura de $+4 - +8$ °C, unde se menține până la utilizare. Determinarea prin FTIR a intensității benzii de la cca 1550 cm^{-1} a permis estimarea unui conținut de xilanază de cea 5 %, care scade la cca 4,5 % după 3 spălări cu câte 20 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei.

REVENDICĂRI

1.Procedeu de obținere a granulelor de polipirol conținând enzime immobilizate covalent, caracterizat prin aceea că granulele de polipirol se introduc într-o baie de funcționalizare formată dintr-o soluție apoasă conținând 10-20 % (volumetric) soluție apoasă de glutardialdehidă 50% (gravimetric) și 1-2 % (volumetric) H_2SO_4 concentrat 98%, raportul între granulele de polipirol și soluția băii de funcționalizare fiind de 1:100-1:200 (masă:volum), baia de funcționalizare având temperatura de $70-80$ °C și granulele se mențin în baie, sub o agitare lentă, timp de 20-40 minute, după care suspensia de granule se lasă să se răcească în aer liber timp de 10-15 minute și se filtrează pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă, turta se spală pe filtru cu apă demineralizată în 3 reprize, fiecare repriză având o cantitate de apă aproximativ egală cu cantitatea de apă folosită la prepararea băii de funcționalizare, apoi granulele funcționalizate obținute sunt introduse într-o baie de imobilizare formată din soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7 conținând 0,3-1,0 % una din enzimele: tirozinază, peroxidaza hreanului sau xilanază, unde se mențin la temperatura camerei (20 °), sub agitare, timp 1-3 ore, raportul între granule și baia de imobilizare fiind de 1: 20- 1: 50 (masă: volum), după care suspensia obținută se filtrează pe un filtru cu hârtie de filtru calitativă, turta se spală cu apă demineralizată în 3 reprize, fiecare repriză utilizând o cantitate de apă egală cu de aproximativ cinci ori cantitatea de soluție tampon folosită la prepararea băii de imobilizare, turta spalată fiind apoi trecută într-o cantitate de soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, astfel încât raportul solid: lichid să fie de 1:20-1:30, și suspensia obținută este menținută până la utilizare într-un vas bine închis introdus în frigider, la temperatura de $+4 - +8$ °C.

