



(11) **RO 128661 B1**

(51) Int.Cl.

**G01N 27/327** (2006.01),

**G01N 27/333** (2006.01),

**C12Q 1/28** (2006.01),

**C12Q 1/30** (2006.01)

(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 00288**

(22) Data de depozit: **01/04/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **26/02/2016** BOPI nr. **2/2016**

(41) Data publicării cererii:  
**30/07/2013** BOPI nr. **7/2013**

(73) Titular:

• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN CLUJ-NAPOCA, 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 VLAHUȚĂ NR.21, AP.45, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**  
• **DIMA ȘTEFAN OVIDIU, STR.ODOBEȘTI NR.5 B, BL.M 7 B, 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.GA 13, AP.1, SLATINA, OT, RO;**  
• **IOVU HORIA, STR.MARIA TÂNASE NR.3, BL.13, SC.B, 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

**T.SANDU ȘI COL., "IMOBILIZAREA POLIFENOLOXIDAZEI PE POLIPIROL ACTIVAT ÎN SCOPUL OBȚINERII DE BIOSENZORI ENZIMATICI", SIMPOZION PRIOCHEM, BUCUREȘTI, 2010; US 4886625**

(54)

### PROCEDEU DE OBȚINERE A GRANULELOR DE POLIPIROL CONȚINÂND ENZIME IMOBILIZATE COVALENT



# RO 128661 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de preparare a granulelor de polipirol  
2 conținând enzime imobilizate covalent, cu aplicații în producerea de biosenzori și în  
3 biotehnologie.

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

7 Se cunosc mai multe metode de imobilizare a enzimelor pe polipirol.

8 Din brevetul **US 4886625** se cunoaște imobilizarea covalentă a enzimelor pe derivați  
9 de polipirol de tipul 2,5 ditienuropirol 3 substituit. Metoda are dezavantajul că folosește monomeri  
10 speciali, iar activarea cu glutaraldehidă se face în soluție tampon, ceea ce complică mult  
11 procedeu și mărește considerabil prețul produselor.

12 Imobilizarea covalentă a enzimelor pe granule de polipirol, prin activare cu  
13 glutaraldehidă în cataliză cu acid sulfuric la 70°C, este redată de **Teodor Sandu, Emilia  
14 Ocnaru, Melania-Liliana Arsenie, Mihaela Badea-Doni, Andrei Sârbu**, în **Imobilizarea  
15 polifenoloxidazei pe polipirol activat în scopul obținerii de biosenzori enzimatici,  
16 Simpozionul "Prioritățile chimiei pentru o dezvoltare dinamică - PRIOCHEM", Ediția  
17 a VI-a, 28-29 octombrie 2010**, în rezumatele lucrărilor. Metoda are dezavantajul că folosește  
18 o temperatură de activare prea mică, ceea ce mărește nejustificat timpul de activare. În plus,  
19 în această referință nu se dau detalii privind parametrii procesului de preparare a granulelor  
20 de polipirol conținând enzime imobilizate covalent.

21 De asemenea, din publicațiile documentelor de brevet **US 7175746** și, respectiv, a  
22 cererii de brevet **US 0228738, 2006**, precum și din articolele **Jianjun Wang, Nosang V.  
23 Myung, Minhee Yun, Harold G. Monbouquette** "Glucose oxidase entrapped în  
24 polypyrrole on high-surface-area Pt electrodes: a model platform for sensitive  
25 electroenzymatic biosensors", *Journal of Electroanalytical Chemistry* **575 (2005) 139-146**  
26 și **S. Tirkes L. Toppare, S. Alkan, U. Bakir, A. Onen, Y. Yagci**, "Immobilization of glucose  
27 oxidase în polypyrrole/polytetrahydrofuran graft copolymers" *International Journal of  
28 Biological Macromolecules* **30 (2002) 81-87**, este cunoscută imobilizarea enzimelor prin  
29 înglobare în filmul de polipirol sau de copolimeri grefați ai acestuia, în timpul  
30 electropolimerizării. Metoda are dezavantajul că o mare parte din enzimă este cuprinsă în  
31 interiorul filmului și, deci, nu are acces la substratul cu care trebuie să reacționeze. În plus,  
32 chiar și enzima aflată pe suprafață are o activitate catalitică redusă, deoarece suprafața  
33 hidrofobă a polimerului nu permite aranjarea centrului activ al enzimei în poziția optimă.

34 De asemenea, din **R. K.Kaneto**, "A new tyrosinase biosensor based on covalent  
35 immobilization of enzyme on N-(3-aminopropyl) pyrrole polymer film", *Current Applied  
36 Physics* **5 (2005) 178-183**, este cunoscută imobilizarea covalentă a enzimelor pe filme de  
37 poli N-3 aminopropil pirol obținute prin electropolimerizare. Metoda are dezavantajul că  
38 necesită prepararea unui monomer special: N-3 aminopropil pirolul, ceea ce complică mult  
39 procesul tehnologic și mărește mult prețul produselor; o mare parte din grupările aminice se  
40 află în interiorul filmului și, deci, nu pot fi folosite la imobilizarea enzimei, iar activitatea  
41 enzimatică a enzimei imobilizate este redusă din cauza apropierii prea mari de suprafața  
42 polimerului.

43 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în imobilizarea covalentă a  
44 enzimelor pe granule de polipirol, prin modificarea suprafeței granulelor prin reacția polimer  
45 analoagă a grupelor NH din polipirol cu grupele CHO din glutardialdehidă, urmată de  
46 imobilizarea covalentă a enzimelor prin reacția grupelor COOH și NH<sub>2</sub> ale proteinei enzimatică  
47 cu grupele CHO, rămase libere, ale dialdehidei legate pe suprafața polimerului, fazele

# RO 128661 B1

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. 1  
3

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 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 72...80°C, și granulele se mențin în baie, sub o agitare lentă, timp de 20...40 min, după care suspensia de granule se lasă să se răcească în aer liber timp de 10...15 min și se filtrează, 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 dintre enzimele: tirozinază, peroxidaza hreanului sau xilanază, unde se mențin la temperatura camerei (20°C), sub agitare, timp 1...3 h, raportul între granule și baia de imobilizare fiind de 1:20...1:50 (masă:volum), după care suspensia obținută se filtrează, 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 într-un vas bine închis, la temperatura de +4...+8°C. 5  
7  
9  
11  
13  
15  
17  
19  
21

Invenția prezintă următoarele avantaje: 23

- asigură o imobilizare a enzimelor în afara structurii polimerului, ceea ce face ca eficiența utilizării enzimelor să fie foarte mare; 25

- 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; 27

- utilizează pentru funcționalizare o substanță de uz industrial, relativ ieftină, precum soluția apoasă 50% de glutardialdehidă; 29

- permite dirijarea activității enzimatice 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; 31  
33

- asigură, prin legăturile covalente, o imobilizare permanentă a enzimei pe polimer, ceea ce evită eluția enzimei în mediul de reacție. 35

Se dau în continuare 8 exemple de realizare a invenției:

## Exemplul 1 37

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  $H_2SO_4$  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 min. Apoi balonul se scoate din baia de apă și se lasă 10...15 min pentru a se răci la temperatura camerei, după care suspensia din balon este filtrată. 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 39  
41  
43  
45  
47

# RO 128661 B1

1 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 mag-  
3 netic 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.  
5 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  
7 lentă timp de 2 h la temperatura camerei (20°C), după care suspensia este filtrată. Turta  
obținută este spălată în 3 reprize cu câte 10 ml apă distilată (folosită în prealabil și la  
9 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,  
11 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 menține la temperatura de +4... +8°C. Determinarea prin FTIR  
13 a intensității benzii peptidice de la circa 1650 cm<sup>-1</sup> a permis estimarea unui conținut de  
tirozinază de circa 8%, care scade la circa 7% după 3 spălări cu câte 20 ml soluție tampon  
15 fosfat 0,1 M cu pH 7, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei.

## Exemplul 2

17 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%  
19 (gravimetric) de glutardialdehidă și 0,4 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrat 98%. Peste această soluție se  
adaugă 0,1 g granule de polipirol și un corp magnetic teflonat. Balonul se introduce într-o  
21 baie de apă, cu temperatura menținută constantă la 72°C (prin recirculare dintr-o altă baie  
de apă, ultratermostată). Baia de apă cu balonul de 30 ml este amplasată pe un agitator  
23 magnetic și se pornește o agitare lentă. Se menține balonul în baie, sub agitare lentă, timp  
de 20 min. Apoi balonul se scoate din baia de apă și se lasă 10...15 min pentru a se răci la  
25 temperatura camerei, după care suspensia din balon este filtrată. Turta este spălată în  
3 reprize cu apă demineralizată având temperatura camerei (20°C). În fiecare repriză de  
27 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  
29 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  
31 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,  
33 rezultată după filtrarea și spălarea granulelor obținute anterior în balonul de 30 ml. Se lasă  
totul sub agitare lentă timp de 1 h la temperatura camerei (20°C), după care suspensia este  
35 filtrată. 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  
37 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  
39 vasul (cu dop și cu membrană) și se menține la temperatura de +4...+8°C. Determinarea prin  
FTIR a intensității benzii peptidice de la circa 1650 cm<sup>-1</sup> a permis estimarea unui conținut de  
41 tirozinază de circa 7%, care scade la circa 6% după 3 spălări cu câte 20 ml soluție tampon  
fosfat 0,1 M cu pH 7, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei.

## Exemplul 3

43 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%  
45 (gravimetric) de glutardialdehidă și 0,15 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrat 98%. Peste această soluție se  
adaugă 0,1 g granule de polipirol și un corp magnetic teflonat. Balonul se introduce într-o  
47 baie de apă, cu temperatura menținută constantă la 75°C (prin recirculare dintr-o altă baie

# RO 128661 B1

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 min. Apoi balonul se scoate din baia de apă și se lasă 10...15 min pentru a se răci la temperatura camerei, după care suspensia din balon este filtrată. 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 h la temperatura camerei (20°C), după care suspensia este filtrată. 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 menține la temperatura de +4...+8°C. Determinarea prin FTIR a intensității benzii peptidice de la circa 1650 cm<sup>-1</sup> a permis estimarea unui conținut de tirozinază de circa 8%, care scade la circa 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, 1ml soluție apoasă 50% (gravimetric) de glutardialdehidă și 0,1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 min. Apoi balonul se scoate din baia de apă și se lasă 10...15 min pentru a se răci la temperatura camerei, după care suspensia din balon este filtrată. 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 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 h la temperatura camerei (20°C), după care suspensia este filtrată. 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 menține la temperatura de +4...+8°C. Determinarea prin FTIR a intensității benzii peptidice de la circa 1650 cm<sup>-1</sup> a permis estimarea unui conținut de peroxidază de circa 9%, care scade la circa 8% după 3 spălări cu câte 20 ml soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei.

# RO 128661 B1

## 1 Exemplul 5

Într-un balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 30 ml, se prepară o soluție de  
3 baie de funcționalizare formată din 15,6 ml apă demineralizată, 4 ml soluție apoasă 50%  
5 (gravimetric) de glutardialdehidă și 0,4 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrat 98%. Peste această soluție se  
7 adaugă 0,1 g granule de polipirol și un corp magnetic teflonat. Balonul se introduce într-o  
9 baie de apă, cu temperatura menținută constantă la 72°C (prin recirculare dintr-o altă baie  
11 de apă, ultratermostată). Baia de apă cu balonul de 30 ml este amplasată pe un agitator  
13 magnetic și se pornește o agitare lentă. Se menține balonul în baie, sub agitare lentă, timp  
15 de 20 min. Apoi balonul se scoate din baia de apă și se lasă 10...15 min, pentru a se răci la  
17 temperatura camerei, după care suspensia din balon este filtrată. Turta este spălată în  
19 3 reprize cu apă demineralizată având temperatura camerei (20°C). În fiecare repriză de  
21 spălare se utilizează câte 16 ml de apă, folosită în prealabil și pentru antrenarea granulelor  
23 rămase în balon. Într-un alt balon de sticlă cu fund plat, cu capacitatea de 10 ml, se introduc  
25 5 ml soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, și 25 mg peroxidaza hreanului (*horse-radish*), și  
27 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 1 h la temperatura camerei (20°C), după care suspensia este  
filtrată. 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 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 menține la temperatura de +4...+8°C. Determi-  
narea prin FTIR a intensității benzii peptidice de la circa 1650 cm<sup>-1</sup> a permis estimarea unui  
conținut de peroxidază de circa 8%, care scade la circa 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 min. Apoi balonul se scoate din baia de apă și se lasă 10...15 min, pentru a se răci la  
temperatura camerei, după care suspensia din balon este filtrată. 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 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 h la temperatura camerei (20°C), după care  
suspensia este filtrată. 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,

# RO 128661 B1

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 menține la temperatura de +4...+8°C. Determinarea prin FTIR a intensității benzii peptidice de la circa 1650 cm<sup>-1</sup> a permis estimarea unui conținut de peroxidază de circa 7%, care scade la circa 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 72°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 min. Apoi balonul se scoate din baia de apă și se lasă 10...15 min pentru a se răci la temperatura camerei, după care suspensia din balon este filtrată. 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 h la temperatura camerei (20°C), după care suspensia este filtrată. 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 menține la temperatura de +4...+8°C. Determinarea prin FTIR a intensității benzii de la circa 1550 cm<sup>-1</sup> a permis estimarea unui conținut de xilanază de circa 6%, care scade la circa 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 min. Apoi balonul se scoate din baia de apă și se lasă 10...15 min, pentru a se răci la temperatura camerei, după care suspensia din balon este filtrată. 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

# RO 128661 B1

1 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  
3 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  
5 totul sub agitare lentă timp de 3 h la temperatura camerei (20°C), după care suspensia este  
filtrată. Turta obținută este spălată în 3 reprize cu câte 17 ml apă distilată (folosită în prealabil  
7 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,  
9 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 menține la temperatura de +4...+8°C.  
11 Determinarea prin FTIR a intensității benzii de la circa 1550 cm<sup>-1</sup> a permis estimarea unui  
conținut de xilanază de circa 5%, care scade la circa 4,5% după 3 spălări cu câte 20 ml  
13 soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, dovedind immobilizarea covalentă a enzimei.



# RO 128661 B1

## Revendicare

1

Procedeu de obținere a granulelor de polipirol conținând enzime immobilizate covalent, în care funcționalizarea se realizează cu glutardialdehidă prin cataliza cu acid sulfuric, **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 72...80°C, și granulele se mențin în baie, sub o agitare lentă, timp de 20...40 min, după care suspensia de granule se lasă să se răcească în aer liber timp de 10...15 min și se filtrează, 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 dintre enzimele: tirozinază, peroxidaza hreanului sau xilanază, unde se mențin la temperatura de 20°C, sub agitare, timp 1...3 h, raportul între granule și baia de imobilizare fiind de 1:20...1:50 masă:volum, după care suspensia obținută se filtrează, 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 la temperatura de +4...+8°C.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 100/2016