



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00920**

(22) Data de depozit: **03/12/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/11/2017** BOPI nr. 11/2017

(41) Data publicării cererii:
30/06/2014 BOPI nr. 6/2014

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
ȘI DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ
"HORIA HULUBEI", STR.REACTORULUI
NR.30, MĂGURELE, IF, RO**

(72) Inventatori:
• **DOROBANȚU IOAN,
ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR.1, BL.OD 2,
SC.C, AP.110, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **NEAGU LIVIA,
STR.ALEXANDRU LĂPUȘNEANU NR.81,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**K. PHAUGAT ȘI COL. "POLYETHYLENE
TEREPHTHALATE MEMBRANE AS A
SUPPORT FOR COVALENT**

**IMMOBILIZATION OF URICASE AND ITS
APPLICATION IN SERUM URATE
DETERMINATION", J. MOL. CAT. B:
ENZYMATIC, ELSEVIER, NR. 1, VOL. 62,
PP. 27-31, AMSTERDAM, 2010;**
**P.K. NAKANE, A. KAWAOI,
"PEROXIDASE-LABELED ANTIBODY
A NEW METHOD OF CONJUGATION",
THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY
AND CYTOCHEMISTRY, NR. 12, VOL. 22,
PP. 1084-1091, 1974; L. P. BUDNIKOVA,
A. N. ERYOMIN, "SYNTHESIS AND
PROPERTIES OF HORSERADISH
PEROXIDASE COPOLYMERS", APPLIED
BIOCHEMISTRY AND MICROBIOLOGY,
NR. 2, VOL. 42, PP. 127-133, 2006;**
**B. PALSSON ȘI COL., "PRINCIPLES AND
APPLICATIONS IN ENGINEERING SERIES.
TISSUE ENGINEERING", CAP. 9,
PP. 9-5-9-6, ED. CRC PRESS, NEW YORK,
2003**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE
A POLIETILENTEREFTALAT-
HEXAMETILENDIAMINO-PEROXIDAZEI**



1 Invenția se referă la un procedeu de obținere a poliesterului marcat enzimatic,
2 polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidază, utilizat în studii privind stabilitatea enzimatică
3 legată covalent la faze solide, necesare în obținerea de biosenzori de dozare enzimatici.

4 În prezent, se cunosc metode pentru imobilizarea enzimei pe un suport polimeric
5 solid [brevet de invenție număr **EP 2011/073794**, **L. Gardossi, P. Spizzo, D. Fattor, L.**
6 **Sinigoï, "Method for covalent immobilization of enzymes on functionalized solid**
7 **polymeric supports"**], în care se utilizează amestecuri de faze organice și apoase ce conțin
8 enzima care urmează a fi cuplată. Enzimele utilizate sunt lipaze, hidrolaze, oxidoreductaze,
9 și solvenții organici ca hexan, toluen, tert-butanol, ce pot ataca faza solidă utilizată și conduc
10 la scăderea activității specifice enzimatică precum și proceduri complexe implicând faze
11 multiple și timp îndelungat.

12 În lucrarea științifică "**Polyethylene terephthalate membrane as a support for**
13 **covalent immobilization of uricase and its application in serum urate determination**"
14 **J. Mol. Cat. B: Enzymatic, Elsevier, Amsterdam, Olanda, vol. 62, nr. 1, 2010-01-02, pag**
15 **27-31**, avându-i ca autori pe **K. Phaugat, M. Bhambi, Renu, și C.S. Pundir**, se prezintă
16 imobilizarea covalentă a uricazei pe membrană de polietilentereftalat (PET) prin intermediul
17 carbodiimidiei. În această lucrare, folia de PET este tratată cu NaOH 10 M, timp de 12...24 h,
18 și apoi spălată cu o soluție de 50% H₂SO₄, timp de 2 h. După spălare, folia este tratată cu
19 tampon NaOH-glicină 0,05M, iar ulterior, pe folia astfel tratată este cuplată uricaza.

20 În articolul științific **P. K. Nakane, A. Kawaoi "Peroxidase-Labeled Antibody A New**
21 **Method of Conjugation"**, **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1974, Vol.**
22 **22, Nr. 12, pp.1084-1091**, se prezintă o metodă de conjugare a peroxidazei din hrean cu
23 proteine. Metoda presupune blocarea grupărilor α- și ε-amino și a grupărilor hidroxil, rămase
24 libere în molecula peroxidazei, cu 2,4-dinitrofluorbenzen (FDNB) în prezență de bicarbonat
25 de sodiu și etanol, urmată de dializă și de oxidarea peroxidazei cu NaIO₄, cu formarea
26 aldehyd-peroxidazei, care ulterior poate fi cuplată la un anticorp, iar conjugatul obținut poate
27 fi stabilizat cu NaBH₄. Metoda descrisă este complexă, consumatoare de timp, iar producții
28 de oxidare pot afecta pe termen lung activitatea enzimei. În plus, articolul nu menționează
29 obținerea derivaților hexametilendiamin-peroxidază care sunt utilizați la cuplajul covalent pe
30 suprafața PET.

31 Lucrarea științifică **L.P. Budnikova, A. N. Eryomin "Synthesis and Properties of**
32 **Horseradish Peroxidase Copolymers"**, **Applied Biochemistry and Microbiology, 2006,**
33 **Vol. 42, Nr. 2, pp. 127-133** prezintă copolimerizarea peroxidazei prin oxidarea peroxidazei
34 cu periodat de sodiu cu obținerea peroxidazei oxidate, care apoi este copolimerizată cu per-
35 oxidază, în prezență de soluție tampon, pH=9, și hexametilendiamină, iar copolimerul obținut
36 este ulterior redus cu borohidruură de sodiu. Articolul nu menționează obținerea derivaților
37 hexametilendiamin-peroxidază care sunt utilizați la cuplajul covalent pe suprafața PET.

38 Din literatură se mai cunoaște că grupările carboxilice se pot activa concomitent cu
39 reacția de cuplare, de exemplu reacția concomitentă cu 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbo-
40 diimidă (EDC) și N-hidroxisuccinimidă [**B. Palsson și colab. "Principles and Applications**
41 **in Engineering Series.Tissue Engineering"**, cap 9, pp. 9-5-9-6, ed. CRC Press, New
42 York, 2003, e-Book-PDF ISBN: 13:978-0-203-01142-3].

43 Problema tehnică pe care își propune să o rezolve invenția este aceea de a imobiliza
44 peroxidaza pe un suport solid folosind mai puține etape de procedeu, într-un timp mai redus
45 și fără a altera activitatea enzimatică specifică a peroxidazei native.

46 Procedeu conform invenției de obținere a produsului polietilentereftalat-hexametilen-
47 diamino-peroxidază constă în aceea că:

48 - se tratează chimic benzi transparente de poliester polietilentereftalat de dimensiuni
49 0,5 cm x 5 cm, prin imersie în soluție de NaOH 2 M, la temperatura de 50°C, timp de 30 min,
în vederea scindării grupărilor esterice de la suprafața polietilentereftalatului, urmat de

RO 129563 B1

spălare cu apă distilată și uscare, apoi benzile sunt imersate într-o soluție de 100 mg 1-etil-3-	1
-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă și 25 mg N-hidroxisuccinimidă în 10 ml dimetilfor-	3
mamidă, timp de 3 h, la temperatura camerei, pentru activarea grupărilor carboxil libere de	
la suprafața polietilentereftalatului;	
- se obține un derivat enzimatic prin dizolvarea a 5 mg peroxidază în 1 ml de tampon	5
fosfat 10 mM, la pH 7,2, apoi se adaugă 0,5 ml soluție de 30 mg/ml NaIO ₄ în apă distilată,	7
timp de 30 min, pentru oxidarea carbohidraților din structura enzimei, cu obținerea de bis-	
-aldehidă, urmat de purificare pe Sephadex G25, eluent fiind tampon fosfat 10 mM pH 7,2,	9
apoi 3 ml de eluat enzimatic rezultat sunt combinați cu 1 ml soluție de 1 mg/ml hexametilen-	
diamină în tampon carbonat 50 mM, pH 9,6, și sunt lasați să reacționeze 3 h, pentru forma-	11
rea unui derivat de peroxidază de tip bază Schiff, după care soluția care conține derivatul de	
peroxidază este purificată prin cromatografie pe Sephadex G25, apoi 3 ml din eluatul care	13
conține derivatul de peroxidază sunt combinați cu o soluție de 1 mg/ml borohidruură de sodiu	
în apă distilată, pentru reducerea bazei Schiff, cu obținerea derivatului peroxidază-hexa-	15
metilendiamină, care este purificat pe Sephadex G25;	
- se introduc benzile de polietilentereftalat activate în eluatul derivatului peroxidază-	17
hexametilendiamină pentru cuplajul covalent, reacție desfășurată pe perioada de 12 h la 4°C,	
iar apoi produsul polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidază este depozitat la -20°C	19
în vederea utilizării.	
Prin procedeul conform invenției se obține poliesterul marcat enzimatic polietilenter-	21
eftalat-hexametilendiamino-peroxidază, într-un timp mult mai scurt, de aproximativ 3...5 h, față	
de procedeele similare de imobilizare a altor enzime pe suport PET prezentate în stadiul	23
tehnicii. Totodată, produsul rezultat prin procedeul conform invenției prezintă o activitate	
enzimatică specifică nealterată comparativ cu enzima nativă.	
Procedeul conform invenției constă în aceea că benzi transparente de poliester, poli-	25
etilentereftalat (PET), de dimensiuni 0,5 cm x 5 cm, sunt tratate prin imersie în soluție de	27
hidroxid de sodiu 2 M, la temperatura de 50°C, pentru scindarea grupărilor esterice de la	
suprafața polimerului, timp de 30 min, urmat de spălare cu apă distilată și uscare, apoi	29
benzile sunt imersate într-o soluție de 100 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă	
și 25 mg N-hidroxisuccinimidă în 10 ml dimetilformamidă, timp de 3 h, pentru activarea gru-	31
părilor carboxil libere existente la suprafața polimerului. Benzile de poliester astfel tratate au	
fost utilizate la cuplajul covalent cu derivatul enzimatic. Pentru obținerea derivatului enzi-	33
matic, inițial s-au dizolvat 5 mg peroxidază în 1 ml de tampon fosfat 10 mM, la pH 7,2, la care	
apoi s-a adăugat 0,5 ml soluție de 30 mg/ml NaIO ₄ în apă distilată, timp de 30 min, pentru	35
oxidarea carbohidraților din structura enzimei, cu obținerea de bisaldehidă, urmat de îndepăr-	
tarea agentului oxidant prin cromatografie pe coloana de Sephadex G25. Eluatul enzimatic,	37
3 ml, a fost apoi combinat cu 1 ml soluție de 1 mg/ml hexametilendiamină, în tampon	
carbonat 50 mM la pH 9,6, reacția de obținere a bazei Schiff având loc pe durata a 3 h, apoi	39
produsul obținut s-a purificat pe Sephadex G25, eluent tampon fosfat 10 mM, pH 7,2. Eluatul	
enzimatic, 3 ml, a fost apoi tratat cu o soluție de 1 mg/ml NaBH ₄ în vederea reducerii bazei	41
Schiff și formării derivatului hexametilendiamino-peroxidază, pe durata de 3 h, apoi a fost	
purificat prin cromatografie pe Sephadex G25. În eluatul derivatului enzimatic s-au introdus	43
benzile de PET activate. Reacția de obținere a derivatului enzimatic hexametilendiamin-	
peroxidază se desfășoară pe o durată de 3 h la temperatura camerei, apoi în amestecul cu	45
derivat enzimatic se introduc benzile de PET activate. Reacția de cuplare a derivatului	
enzimatic la faza solidă s-a desfășurat timp de 12 h la temperatura de 4°C. Produsul obținut,	47
polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidaza, a fost depozitat la -20°C, în vederea	
utilizării în studii necesare în obținerea de biosenzori de dozare enzimatici.	

RO 129563 B1

1 Procedeul de obținere a produsului polietilentereftalat- hexametilendiamino-peroxidază constă în 6 etape:

3 E1: Activarea chimică a poliesterului polietilentereftalat (PET)
Benzi de polietilentereftalat de dimensiuni (0,5 cm x 5 cm) sunt imersate într-o soluție de NaOH 2 M, la temperatura de 50°C, timp de 30 min, urmată de spălare cu apă și uscare.

5 E2: Activarea grupărilor carboxil de la suprafața polimerului, formate prin tratament chimic la etapa E1

7 Benzile de polietilentereftalat de la etapa E1 sunt imersate într-o soluție de 100 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă și 25 mg N-hidroxisuccinimidă în 10 ml dimetilformamidă timp de 3 h pentru activarea grupărilor carboxi libere de la suprafața polimerului.

11 E3: Oxidarea carbohidraților din structura peroxidazei

13 5 mg peroxidază se dizolvă în 1 ml de tampon fosfat 10 mM pH 7,2, apoi se adaugă 0,5 ml soluție de 30 mg/ml NaIO₄ în apă distilată timp de 30 min în vederea oxidării carbohidraților enzimei și obținerea de bisaldehide. Amestecul se cromatografiază pe Sephadex G25 pentru îndepărtarea agentului oxidant, iar eluatul enzimatic, 3 ml, se utilizează la obținerea derivatului.

17 E4: Obținerea bazei Schiff

19 Peste eluatul enzimatic rezultat prin cromatografie în etapa E3, 3 ml, se adaugă o soluție de 1 mg/ml hexametilendiamină în tampon carbonat 50 mM pH 9,6. Reacția de obținere a bazei Schiff se desfășoară timp de 3 h la temperatura camerei.

21 E5: Obținerea derivatului peroxidază-hexametilendiamină

23 Baza Schiff formată este cromatografiată pe Sephadex G25 cu eluent tamponul fosfat 10 mM pH 7,2. Eluatul ce conține derivatul enzimatic, 3 ml, este tratat cu 1 ml soluție de borohidruură de sodiu 1 mg/ml în vederea reducerii bazei Schiff, iar produsul final hexametilendiamină-peroxidază a fost cromatografiat pe Sephadex G25.

25 E6: Obținerea polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidazei

27 Benzile activate de poliester din etapa E2 sunt imersate în soluția de derivat enzimatic, iar reacția de cuplare la faza solidă (suprafața polimerului) se desfășoară timp de 12 h la 4°C. Benzile se depozitează la -20°C în vederea utilizării în studii necesare în obținerea de biosenzori de dozare enzimatici.

31 Procedeul conform invenției prezintă avantajul că enzima nu este în contact direct cu solvenții organici care pot scădea activitatea enzimatică specifică sau o pot denatura parțial în obținerea derivatului enzimatic ce urmează a fi cuplat covalent la faza solidă. Alte avantaje sunt etapele simple de obținere a produsului final, care nu implică proceduri complexe care să necesite un număr mare de etape de lucru, și durata mică de obținere a produsului final.

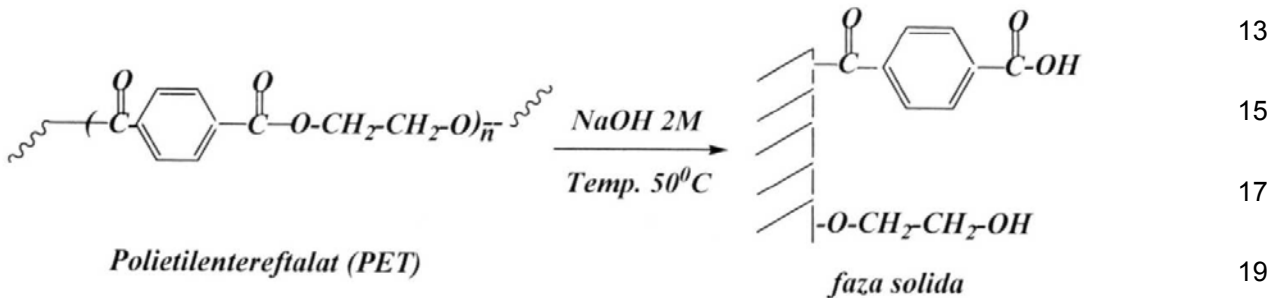
37 Se prezintă mai jos un exemplu de aplicare a procedurii conform invenției pentru obținerea polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidazei. Potrivit invenției, benzi transparente de poliester, polietilentereftalat (PET) de dimensiuni (0,5 cm x 5 cm) sunt tratate chimic prin imersie în soluție de NaOH 2 M la temperatura de 50°C timp de 30 min, în vederea scindării grupărilor esterice de la suprafața polimerului, urmând spălarea cu apă distilată și uscarea lor, după care sunt imersate într-o soluție de 100 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă și 25 mg N-hidroxisuccinimidă în 10 ml dimetilformamidă timp de 3 h la temperatura camerei, pentru activarea grupărilor carboxi libere de la suprafața polimerului; acestea sunt utilizate la cuplajul covalent cu derivatul enzimatic obținut prin dizolvarea a 5 mg peroxidază în 1 ml de tampon fosfat 10 mM pH 7,2 apoi se adaugă 0,5 ml soluție de 30 mg/ml NaIO₄ în apă distilată timp de 30 min pentru oxidarea carbohidraților din structura enzimei cu obținerea de bisaldehidă, urmată de purificare pe Sephadex G 25,

RO 129563 B1

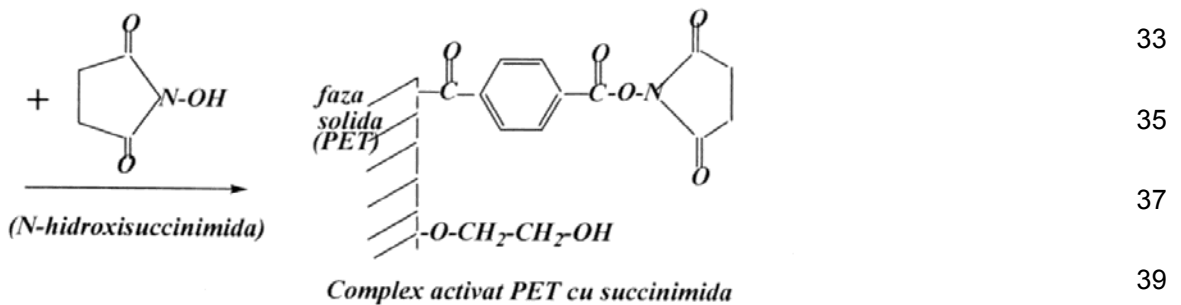
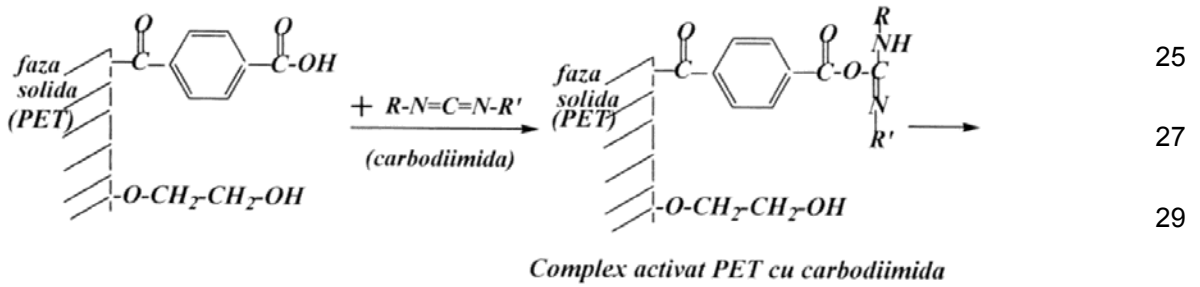
eluent fiind tampon fosfat 10 mM pH 7,2, iar eluatul enzimatic, 3 ml, este combinat cu 1 ml soluție de 1 mg/ml hexametildiamină în tampon carbonat 50 mM pH 9,6, reacția de obținere a bazei Schiff formate se desfășoară pe durata a 3 h, apoi produsul este purificat prin cromatografie pe Sephadex G25, iar eluatul enzimatic, 3 ml, este combinat cu o soluție de 1 mg/ml borohidruță de sodiu (NaBH_4) în apă distilată, pentru reducerea bazei Schiff și obținerea derivatului hexametildiamino-peroxidază, ce este purificat pe Sephadex G25, iar în eluatul derivatului enzimatic sunt introduse benzile de poliester activate pentru cuplajul covalent, reacție desfășurată pe perioada de 12 h la 4°C , iar produsul polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidază este depozitat la -20°C în vederea utilizării.

Reacțiile de obținere a polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidazei sunt:

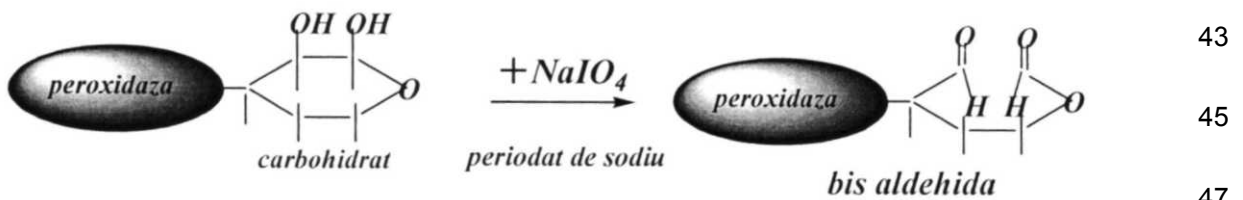
E1: Activarea chimică a suprafeței poliesterului polietilentereftalat (PET)



E2: Activarea grupărilor carboxi de la suprafața polimerului, formate prin tratament chimic la etapa E1

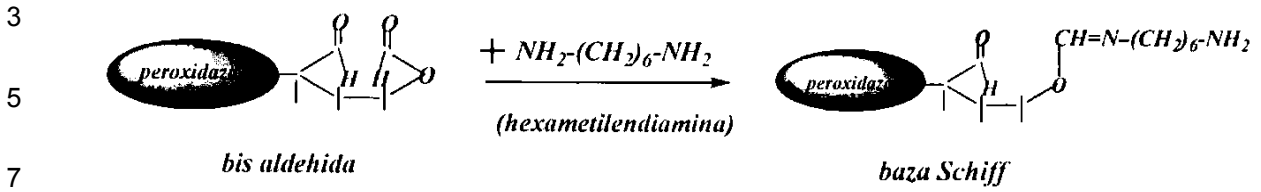


E3. Oxidarea carbohidraților din structura peroxidazei

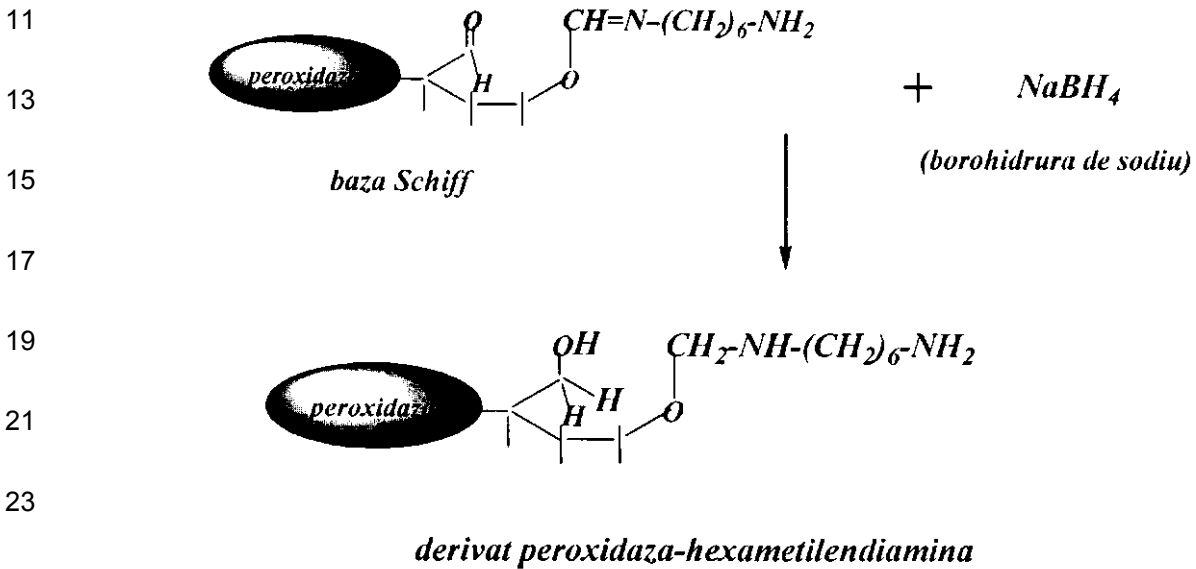


RO 129563 B1

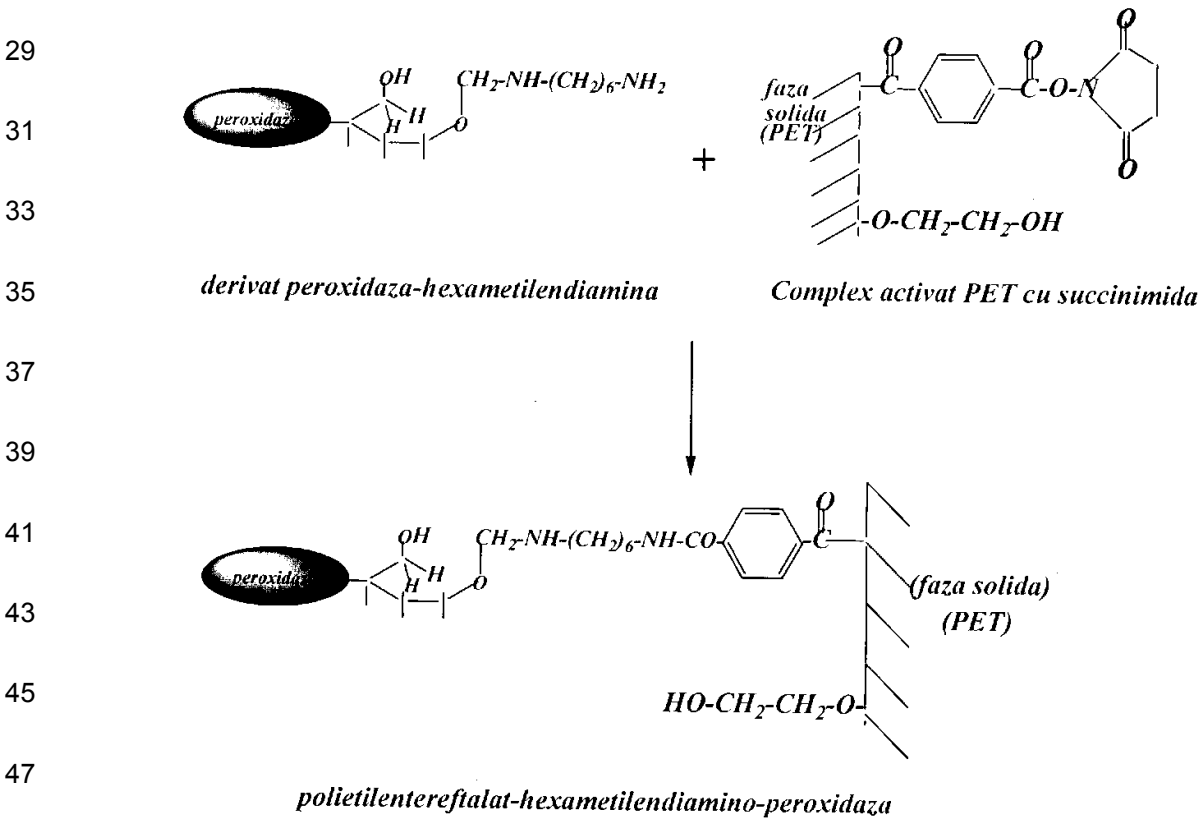
1 E4. Obținerea bazei Schiff



9 E5. Obținerea derivatului peroxidază-hexametilendiamină



27 E6: Obținerea polietilentereftalatului-hexametilendiamino-peroxidazei



RO 129563 B1

În continuare, se prezintă o serie de date experimentale privind activitatea enzimatică a markerului enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamin-peroxidaza, care sunt în legătură cu fig. 1 și 2.

Fig. 1, cinetica de reacție enzimatică. Condiții de reacție: enzima PRH 10 ng/ml (PRH peroxidase from horseradish, type VI-A, 1550 unități/mg solid) în tampon fosfat 10 mM pH 7,2 și substratul enzimatic 50 μl TMB 2,5 mg/ml în amestec acid acetic:apă 1:10 (v/v), 50 μl H₂O₂ 3%. Reacția de oxidare a fost stopată prin separarea cromatografică pe Sephadex G25 a enzimei PRH de oxidant (NaIO₄)

Fig. 2, calculul timpului de înjumătățire al activității enzimatică a PRH obținut din cinetica de reacție la 2 min.

Cantități egale de enzimă peroxidază (PRH peroxidase from horseradish, type VI-A, 1550 unități/mg solid) au fost puse în reacție cu oxidantul NaIO₄ 30 mg/ml în tampon fosfat 10 mM pH 7,2. Reacția de oxidare a fost oprită prin separarea componentelor reacției (enzima oxidată, respectiv oxidantul NaIO₄) prin cromatografie pe coloana de Sephadex G25, (30 x 1) cm eluent tampon fosfat 10 mM, pH 7,2. Timpii de oxidare ai enzimei PRH aleși au fost 3 min, 30 min, 60 min, 6 h și 24 h. Eluatul care conține enzima oxidată a fost colectat, iar activitatea specifică enzimatică a fost comparată față de martor (enzima fără oxidant). Rezultatele analizei sunt redate în graficul de mai jos.

Tabelul 1

Scăderea activității enzimatică a PRH în timp, în prezența oxidantului NaIO₄, unde A_p este activitatea PRH oxidată proporțională cu densitatea optică a PRH măsurată la lungimea de undă de 450 nm (maximul de absorbție al substratului TMB-tetrametilbenzidina oxidat de H₂O₂ în prezența PRH) la 2 min și A_M este activitatea PRH neoxidată proporțională cu densitatea optică a PRH măsurată la lungimea de undă de 450 nm la 2 min

Timp de oxidare	A _p /A _M (%)
3 min	98,20
30 min	85,40
60 min	70,80
6 h	49,35
24 h	13,26

Concluzie:

La 30 min, activitatea enzimatică în procesul de oxidare al PRH, în comparație cu cea de la 3 min, este 85,4% față de 98,2%, deci intervalul de timp de oxidare este optim pentru obținerea markerului enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamin-peroxidază. Activitatea enzimatică la 24 h duce la o scădere de 84,94% față de cea de la 3 min, rezultând, în final, dacă s-ar aplica procedura de oxidare la 24 h, un produs cu activitate enzimatică specifică de 8,49 ori mai mică, ceea ce ar rezulta la scăderea sensibilității de analiză prin folosirea produsului final acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamin-peroxidază în sisteme de dozare.

Din datele experimentale de cinetică enzimatică obținute, activitatea enzimei în procesul de oxidare a fost reprezentată considerând modelul:

$$A_p = A_M e^{-\frac{\ln 2}{T_{1/2}} t_{oxidare}}$$

RO 129563 B1

1 unde:

3 A_p - activitatea enzimatică a probei oxidate, proporțională cu densitatea optică a probei martor la lungimea de undă de 450 nm;

5 A_M - activitatea enzimatică a matorului, enzima PRH neoxidată proporțională cu densitatea optică a probei oxidate la lungimea de undă de 450 nm;

7 $T_{1/2}$ - timpul mediu de oxidare care reduce activitatea enzimei la 50% față de martor (enzima neoxidată) - timp de înjumătățire al activității enzimatice;

9 $t_{oxidare}$ - timpul de oxidare, în cazul de față de 3 min, 30 min, 60 min, 6 h și 24 h.

Tabelul 2

11 *Datele experimentale utilizate la calculul timpului de înjumătățire al activității enzimatică a PRH*

13 Timp de oxidare	Ap/AM	2,303log(AM/AP)
3 min	0,9858	0,014
15 30 min	0,8540	0,158
60 min	0,7081	0,345
17 6 h	0,4935	0,706
24 h	0,1325	2,021

19

21 Din fig. 2, rezultă că $T_{1/2}$, timpul mediu de oxidare care reduce activitatea enzimei la 50% față de martor (enzima neoxidată), este 8,78 h.

RO 129563 B1

Revendicare

1

Procedeu de obținere a polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidază, **caracterizat prin aceea că:**

3

- se tratează chimic benzi transparente de poliester polietilentereftalat de dimensiuni 0,5 cm x 5 cm, prin imersie în soluție de NaOH 2 M, la temperatura de 50°C, timp de 30 min, în vederea scindării grupărilor esterice de la suprafața polietilentereftalatului, urmat de spălare cu apă distilată și uscare, apoi benzile sunt imersate într-o soluție de 100 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă și 25 mg N-hidroxisuccinimidă în 10 ml dimetilformamidă, timp de 3 h, la temperatura camerei, pentru activarea grupărilor carboxil libere de la suprafața polietilentereftalatului;

5

7

9

11

- se obține un derivat enzimatic prin dizolvarea a 5 mg peroxidază în 1 ml de tampon fosfat 10 mM, la pH 7,2, apoi se adaugă 0,5 ml soluție de 30 mg/ml NaIO₄ în apă distilată, timp de 30 min, pentru oxidarea carbohidraților din structura enzimei, cu obținerea de bisaldehidă, urmat de purificare pe Sephadex G25, eluent fiind tampon fosfat 10 mM pH 7,2, apoi 3 ml de eluat enzimatic rezultat sunt combinați cu 1 ml soluție de 1 mg/ml hexametildiamină în tampon carbonat 50 mM, pH 9,6, și sunt lăsați să reacționeze 3 h, pentru formarea unui derivat de peroxidază de tip bază Schiff, după care soluția care conține derivatul de peroxidază este purificată prin cromatografie pe Sephadex G25, apoi 3 ml din eluatul care conține derivatul de peroxidază sunt combinați cu o soluție de 1 mg/ml borohidru de sodiu în apă distilată, pentru reducerea bazei Schiff, cu obținerea derivatului peroxidază-hexametilendiamină, care este purificat pe Sephadex G25;

13

15

17

19

21

- se introduc benzile de polietilentereftalat activate în eluatul derivatului peroxidază-hexametilendiamină pentru cuplajul covalent, reacție desfășurată pe perioada de 12 h la 4°C, apoi produsul polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidază este depozitat la -20°C în vederea utilizării.

23

25

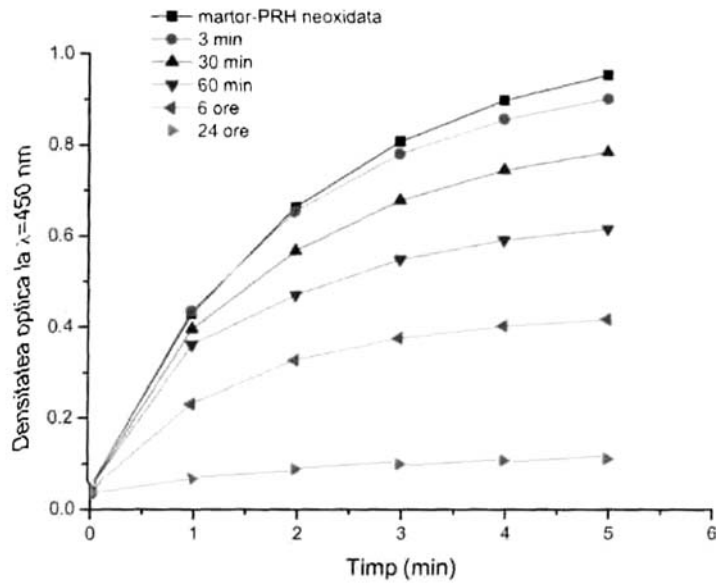


Fig. 1

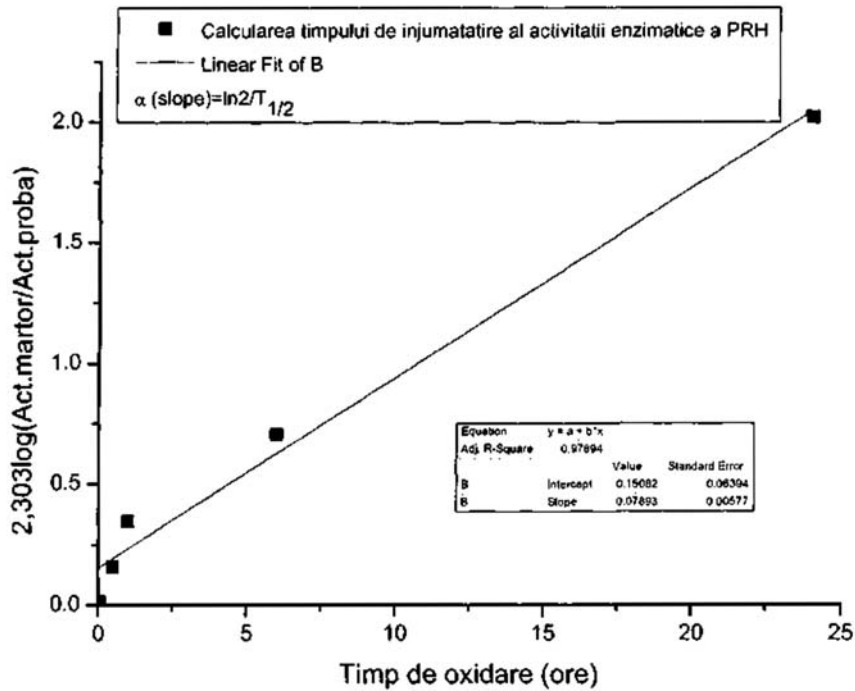


Fig. 2

