



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00920

(22) Data de depozit: 03.12.2012

(41) Data publicării cererii:  
30.06.2014 BOPI nr. 6/2014

(71) Solicitant:  
• 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

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A POLIETILENTEREFTALAT-  
HEXAMETILENDIAMINO-PEROXIDAZA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a poliesterului marcat enzimatic, utilizat pentru fabricarea unor biosenzori de dozare enzimatici. Procedeu conform invenției constă din activarea chimică a poliesterului polietilentereftalat sub formă de benzi, care apoi sunt tratate pentru activarea grupărilor carboxi de la suprafața polimerului, după care sunt imersate într-o soluție

de hexametilendiamina-peroxidază preparată separat, reacția este menținută timp de 12 h la o temperatură de 4°C, după care produsul rezultat, polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidaza, este depozitat la o temperatură de -20°C, în vederea utilizării.

Revendicări: 1



## DESCRIERE

### Procedeu de obtinere a polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidaza

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a poliesterului marcat enzimatic, polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidaza utilizat in studii privind stabilitatea enzimatica legata covalent la faze solide, studii necesare in obtinerea de biosenzori de dozare enzimatici.

In prezent se cunosc metode pentru imobilizarea enzimei pe un suport polimeric solid [brevet de inventie numar PCT/EP2011/073794, L. Gardossi, P. Spizzo, D. Fattor, L. Sinigoj, Method for covalent immobilization of enzymes on functionalized solid polymeric supports], in care se utilizeaza amestecuri de faze organice si apoase ce contin enzima care urmeaza a fi cuplata. Enzimele utilizate sunt lipaze, hidrolaze, oxidoreductaze si solventii organici ca hexan, toluen, tert-butanol ce pot ataca faza solida utilizata si conduc la scaderea activitatii specifice enzimaticice precum si proceduri complexe implicand faze multiple si timp indelungat.

Procedeu conform inventiei consta in aceea ca benzi transparente de poliester, polietilentereftalat (PET) de dimensiuni (0,5 cm x 5 cm) sunt tratate prin imersie in solutie de hidroxid de sodiu 2 M la temperatura de 50 °C pentru scindarea gruparilor esterice de la suprafata polimerului timp de 30 minute urmata de spalare cu apa distilata si uscate, apoi imersate intr-o solutie de 100 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida si 25 mg N-hidroxisuccinimida in 10 ml dimetilformamida timp de 3 ore pentru activarea gruparilor carboxi libere existente la suprafata polimerului. Benzile de poliester astfel tratate au fost utilizate la cuplajul covalent cu derivatul enzimatic obtinut prin dizolvarea a 5 mg peroxidaza in 1 ml de tampon fosfat 10 mM pH 7.2 apoi se adauga 0.5 ml solutie de 30 mg/ml NaIO<sub>4</sub> in apa distilata timp de 30 minute pentru oxidarea carbohidratilor din structura enzimei cu obtinerea de bisaldehida, urmata de indepartarea agentului oxidant prin cromatografie pe coloana de Sephadex G25 iar eluatul enzimatic, 3 ml, este combinat cu 1 ml solutie de 1 mg/ml hexametildiamina in tampon carbonat 50 mM pH 9.6. reactia de obtinere a bazei Schiff se desfasoara pe durata a 3 ore apoi produsul obtinut se purifica pe Sephadex G25, eluent tampon fosfat 10 mM pH 7.2 iar eluatul enzimatic, 3 ml, este tratat cu o solutie de 1 mg/ml NaBH<sub>4</sub> in vederea reducerii bazei Schiff si formarea derivatului hexametildiamino-peroxidaza pe durata de 3 ore apoi se purifica prin cromatografie pe Sephadex G25 iar in eluatul derivatului enzimatic se introduc benzile de PET activate. Reactia de obtinere a derivatului enzimatic hexametildiamin-peroxidaza se desfasoara pe o durata de 3 ore la temperatura camerei, apoi in amestecul cu derivat enzimatic se introduc benzile de PET activate. Reactia de cuplare a derivatului enzimatic la faza solida s-a desfasurat timp de 12 ore la temperatura de 4 °C. Produsul obtinut polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidaza a fost depozitat la -20 °C in vederea utilizarii in studii necesare in obtinerea de biosenzori de dozare enzimatici.

Procedeu de obtinere a produsului polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidaza consta in 6 etape:

#### **E1: Activarea chimica a poliesterului polietilentereftalat (PET)**

Benzi de polietilentereftalat de dimensiuni (0,5 cm x 5 cm) sunt imersate intr-o solutie de NaOH 2 M la temperatura de 50 °C timp de 30 minute urmata de spalare cu apa si uscate.

#### **E2: Activarea gruparilor carboxi de la suprafata polimerului formate prin tratament chimic la etapa E1**

Benzile de polietilentereftalat de la etapa E1 sunt imersate intr-o solutie de 100 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida si 25 mg N-hidroxisuccinimida in 10 ml dimetilformamida timp de 3 ore pentru activarea gruparilor carboxi libere de la suprafata polimerului.



Director General IFIN-HH,  
Dr. Nicolae Victor Zamfir

### E3: Oxidarea carbohidratilor din structura peroxidazei

5 mg peroxidaza se dizolva in 1 ml de tampon fosfat 10 mM pH 7.2, apoi se adauga 0.5 ml solutie de 30 mg/ml  $\text{NaIO}_4$  in apa distilata timp de 30 minute in vederea oxidarii carbohidratilor enzimei si obtinerea de bisaldehide. Amestecul se cromatografiază pe Sephadex G25 pentru indepartarea agentului oxidant, iar eluatul enzimatic, 3 ml, se utilizeaza la obtinerea derivatului.

### E4: Obținerea bazei Schiff

Peste eluatul enzimatic rezultat prin cromatografie in etapa E3, 3 ml, se adauga o solutie de 1 mg/ml hexametildiamina in tampon carbonat 50 mM pH 9.6. Reactia de obtinere a bazei Schiff se desfasoara timp de 3 ore la temperatura camerei.

### E5: Obținerea derivatului peroxidaza-hexametilendiamina

Baza Schiff formata este cromatografiata pe Sephadex G25 cu eluent tamponul fosfat 10 mM pH 7.2. Eluatul ce contine derivatul enzimatic, 3 ml, este tratat cu 1 ml solutie de borohidrua de sodiu 1 mg/ml in vederea reducerii bazei Schiff iar produsul final hexametildiamina-peroxidaza a fost cromatografiat pe Sephadex G25.

### E6: Obținerea polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidaza

Benzile activate de poliester din etapa E2 sunt imersate in solutia de derivat enzimatic, iar reactia de cuplare la faza solida (suprafata polimerului) se desfasoara timp de 12 ore la 4 °C. Benzile se depoziteaza la -20 °C in vederea utilizarii in studii necesare in obtinerea de biosenzori de dozare enzimatici.

Procedeul conform inventiei prezinta avantajul ca enzima nu este in contact direct cu solventii organici care pot scadea activitatea enzimatica specifica sau o pot denatura partial in obtinerea derivatului enzimatic ce urmeaza a fi cuplat covalent la faza solida. Alte avantaje sunt etapele de obtinere a produsului final simple care nu implica proceduri complexe care sa necesite un numar mare de etape de lucru si durata mica de obtinere a produsului final.

Se prezinta mai jos un exemplu de aplicare a procedeului conform inventiei pentru obtinerea polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidaza. Potrivit inventiei benzi transparente de poliester, polietilentereftalat (PET) de dimensiuni (0,5 cm x 5 cm) sunt tratate chimic prin imersie in solutie de NaOH 2 M la temperatura de 50 °C timp de 30' in vederea scindarii gruparilor esterice de la suprafata polimerului urmat de spalarea cu apa distilata si uscate, apoi imersate intr-o solutie de 100 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida si 25 mg N-hidroxisuccinimida in 10 ml dimetilformamida timp de 3 ore la temperatura camerei pentru activarea gruparilor carboxi libere de la suprafata polimerului si care sunt utilizate la cuplajul covalent cu derivatul enzimatic obtinut prin dizolvarea a 5 mg peroxidaza in 1 ml de tampon fosfat 10 mM pH 7.2 apoi se adauga 0.5 ml solutie de 30 mg/ml  $\text{NaIO}_4$  in apa distilata timp de 30 minute pentru oxidarea carbohidratilor din structura enzimei cu obtinerea de bisaldehida, urmata de purificare pe Sephadex G 25 eluent fiind tampon fosfat 10 mM pH 7.2 iar eluatul enzimatic, 3 ml, este combinat cu 1 ml solutie de 1 mg/ml hexametildiamina in tampon carbonat 50 mM pH 9.6 reactia de obtinere a bazei Schiff formate se desfasoara pe durata a 3 ore apoi produsul este purificat prin cromatografie pe Sephadex G25 iar eluatul enzimatic, 3 ml, este combinat cu o solutie de 1 mg/ml borohidrua de sodiu ( $\text{NaBH}_4$ ) in apa distilata pentru reducerea bazei Schiff si obtinerea derivatului hexametildiamino-peroxidaza ce este purificat pe Sephadex G25, iar in eluatul derivatului enzimatic sunt introduse benzile de poliester activate pentru cuplajul covalent, reactie desfasurata pe perioada de 12 ore la 4 °C, iar produsul polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidaza este depozitat la -20 °C in vederea utilizarii.

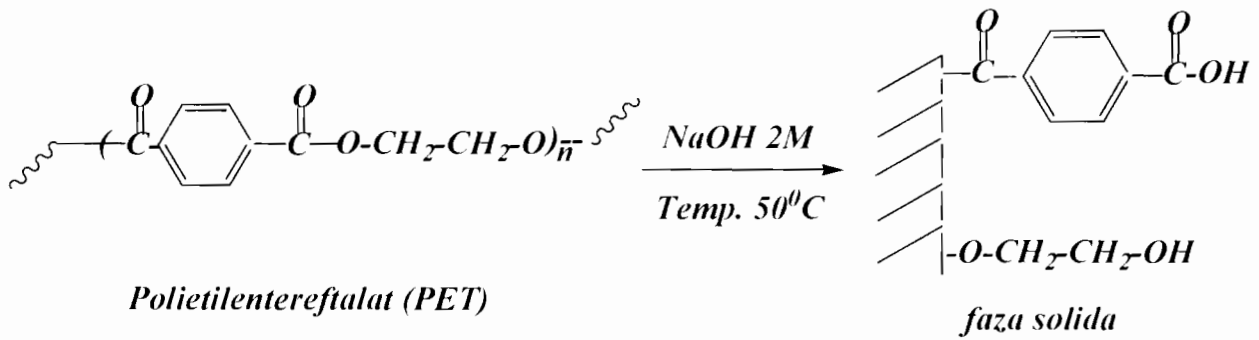
Reactiile de obtinere a polietilentereftalat-hexametilendiamino-peroxidazei sunt:



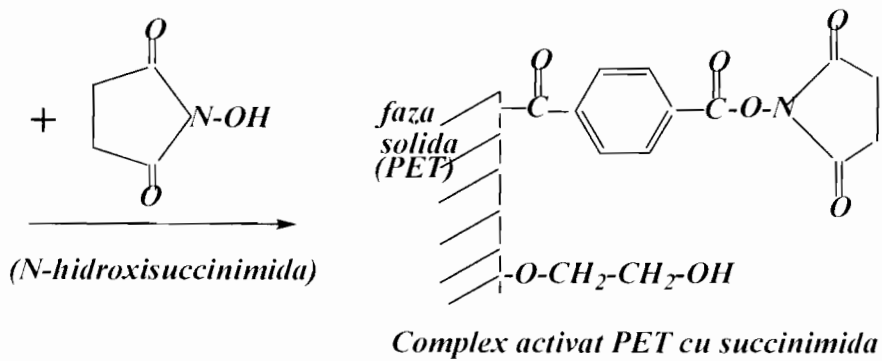
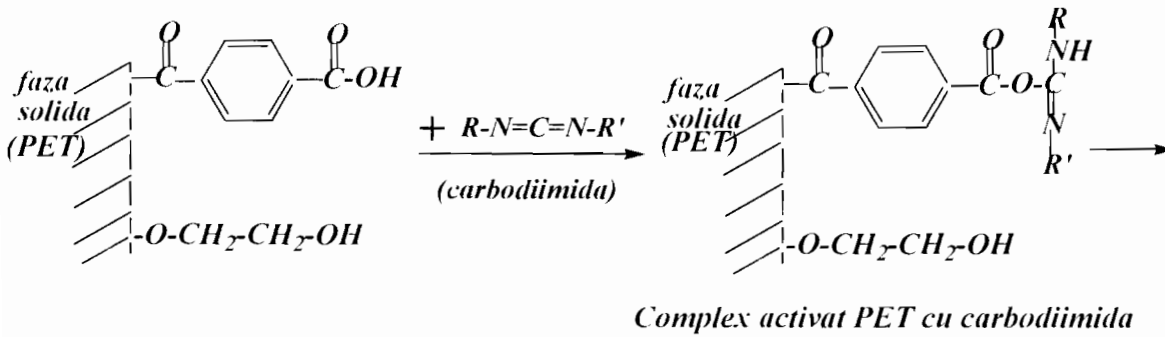
Director General IFIN-HH,  
Dr. Nicolae Victor Zamfir

*N. Zamfir*

**E1: Activarea chimica a suprafetei poliesterului polietilentereftalat (PET)**

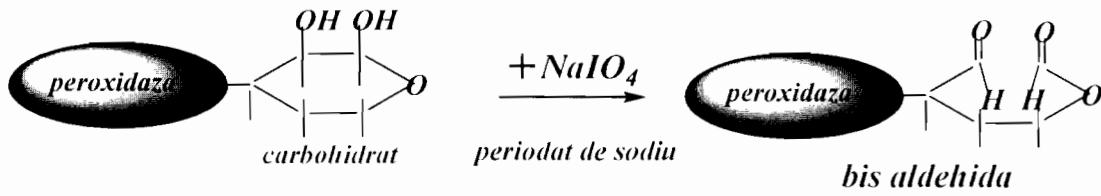


**E2: Activarea gruparilor carboxi de la suprafata polimerului formate prin tratament chimic la etapa E1**

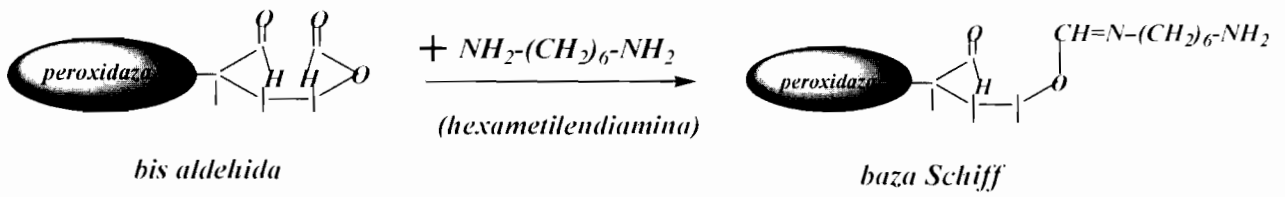


Director General IFIN-HH,  
Dr. Nicolae Victor Zamfir

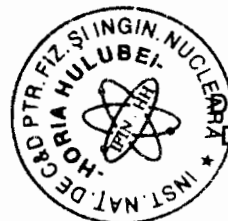
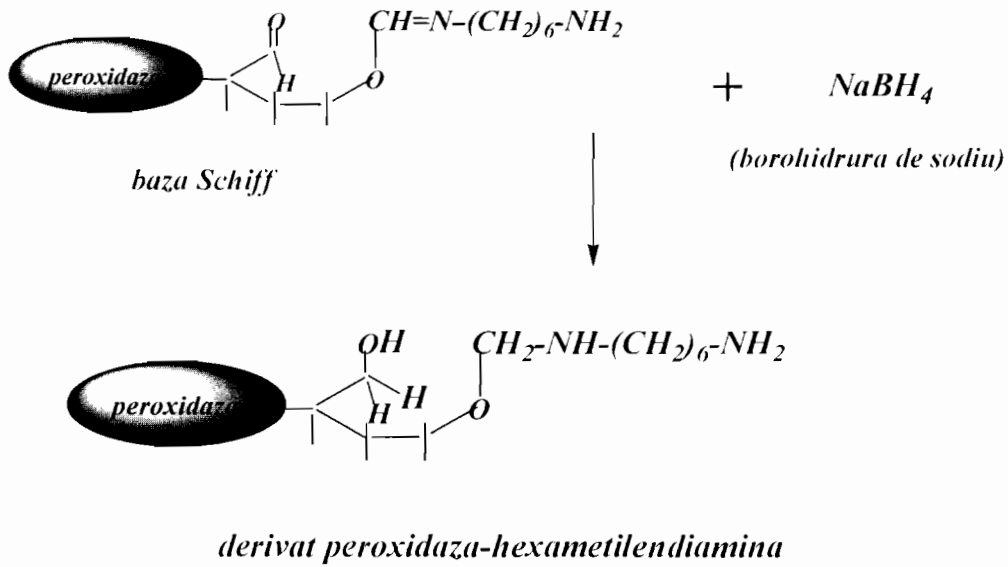
**E3. Oxidarea carbohidratilor din structura peroxidazei**



**E4. Obținerea bazei Schiff**



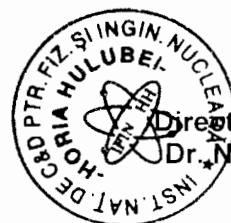
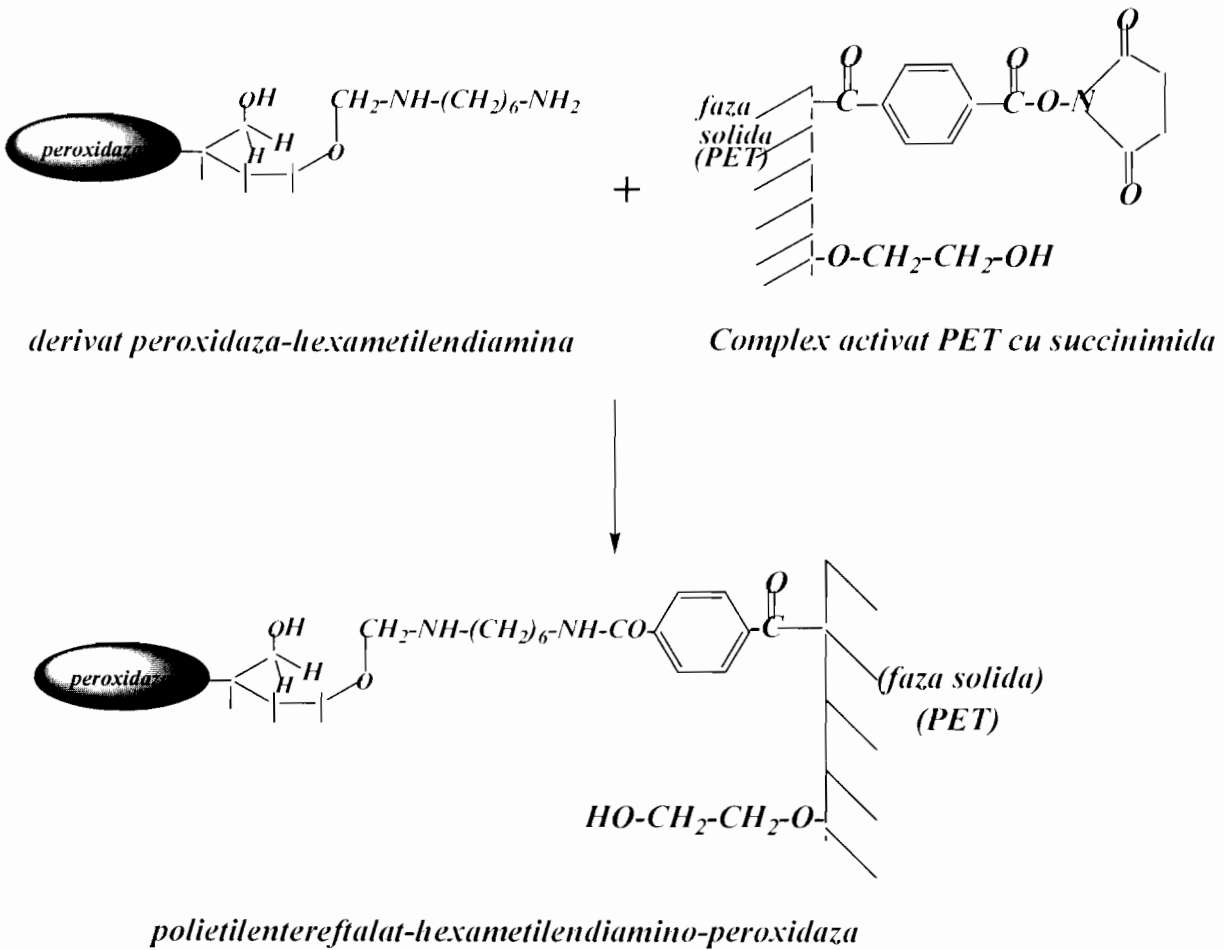
**E5. Obținerea derivatului peroxidaza-hexametilendiamina**



Director General IFIN-HH, 4  
 Dr. Nicolae Victor Zamfir

*(Handwritten signature)*

E6: Obținerea polietilentereftalatului-hexametilendiamino-peroxidaza



Director General IFIN-HH,  
Dr. Nicolae Victor Zamfir

## REVENDICARI

Procedeul conform inventiei consta in aceea ca benzi transparente de poliester, polietilentereftalat (PET) de dimensiuni (0.5 cm x 5 cm) sunt tratate chimic prin imersie in solutie de NaOH 2 M la temperatura de 50 °C timp de 30' in vederea scindarii gruparilor esterice de la suprafata polimerului urmat de spalarea cu apa distilata si uscate, apoi imersate intr-o solutie de 100 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida si 25 mg N-hidroxisuccinimida in 10 ml dimetilformamida timp de 3 ore la temperatura camerei pentru activarea gruparilor carboxi libere de la suprafata polimerului si care sunt utilizate la cuplajul covalent cu derivatul enzimatic obtinut prin dizolvarea a 5 mg peroxidaza in 1 ml de tampon fosfat 10 mM pH 7.2 apoi se adauga 0.5 ml solutie de 30 mg/ml NaIO<sub>4</sub> in apa distilata timp de 30 minute pentru oxidarea carbohidratilor din structura enzimei cu obtinerea de bisaldehida, urmata de purificare pe Sephadex G 25 eluent fiind tampon fosfat 10 mM pH 7.2 iar eluatul enzimatic, 3 ml. este combinat cu 1 ml solutie de 1 mg/ml hexametildiamina in tampon carbonat 50 mM pH 9.6 reactia de obtinere a bazei Schiff formate se desfasoara pe durata a 3 ore apoi produsul este purificat prin cromatografie pe Sephadex G25 iar eluatul enzimatic, 3 ml. este combinat cu o solutie de 1 mg/ml borohidrua de sodiu (NaBH<sub>4</sub>) in apa distilata pentru reducerea bazei Schiff si obtinerearea derivatului hexametildiamino-peroxidaza ce este purificat pe Sephadex G25, iar in eluatul derivatului enzimatic sunt introduse benzile de poliester activate pentru cuplajul covalent. reactie desfasurata pe perioada de 12 ore la 4 °C, iar produsul polietilentereftalat-hexametildiamino-peroxidaza este depozitat la -20 °C in vederea utilizarii.



Director General IFIN-HH,  
Dr. Nicolae Victor Zamfir

*N. Zamfir*