



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00139**

(22) Data de depozit: **08/02/2013**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/10/2018** BOPI nr. **10/2018**

(41) Data publicării cererii:  
**29/08/2014** BOPI nr. **8/2014**

(73) Titular:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **SARBU ANDREI, STR. VALEA OLTULUI  
NR. 16, BL. A28, SC. C, ET. 2, AP. 37,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **SANDU TEODOR, STR. PARÂNGULUI  
NR. 43A, ET. 1, AP. 4, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **SARBU LILIANA, STR. VALEA OLTULUI  
NR. 16, BL. A28, SC. C, ET. 2, AP. 37,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **LUNGU ANAMARIA, STR. STÂNJENILOR  
NR.8, BL.1, SC.A, ET.2, AP.9, SINAIA, PH,  
RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**GB 1474594; RO 123276 B1**

(54) **MEMBRANE ACRILICE BICOMPONENTE  
MULTIFUNCȚIONALE ȘI PROCEDU DE OBȚINERE  
A ACESTORA**



# RO 129706 B1

1 Prezentă invenție se referă la obținerea unor membrane acrilice bicomponente  
multifuncționale, cu funcție de micro sau ultrafiltrare și cu bune proprietăți mecanice, pe care  
3 sunt imobilizate covalent enzime, cu aplicații în filtrarea apelor uzate și în biotehnologie, precum  
și la procedeul de obținere a acestora.

5 Pentru obținerea de membrane polimerice de ultra și microfiltrare conținând enzime  
imobilizate covalent, se pot utiliza membrane pe bază de poliacrilonitril sau pe bază de  
7 copolimeri ai acrilonitrilului.

Se cunosc mai multe metode de obținere a suporturilor pe bază de poliacrilonitril sau  
9 copolimeri ai acrilonitrilului pentru imobilizarea covalentă a enzimelor.

O posibilitate de obținere de suporturi pe bază de poliacrilonitril pentru imobilizarea  
11 covalentă a enzimelor o reprezintă modificarea grupelor cian de pe suprafața polimerică la  
grupări amidice sau de tip clorură acidă și a fost aplicată pe granule de homopolimer sau de  
13 copolimeri de acrilonitril. Metoda are dezavantajul că nu este indicată a se aplica pentru  
obținerea membranelor, deoarece poate afecta structura acestora, cu efecte negative asupra  
15 proprietăților membranelor. Metoda este dificil de controlat și nu permite evitarea efectului  
negativ al microvecinătății enzimei cu suprafața polimerului [EP 0397119B1].

O metodă pentru obținerea de membrane de micro și ultrafiltrare conținând enzime  
17 imobilizate covalent este reprezentată de activarea suprafeței membranei de poliacrilonitril în  
vederea formării de grupe funcționale de tip amină de care să se lege covalent enzima prin  
19 intermediul unei carbodiimide [P. R. S. Leirião, L. J. P. Fonseca, M. A. Taipa, J. M. S. Cabral,  
și M. Mateus, “*Horseradish Peroxidase Immobilized Through Its Carboxylic Groups onto  
21 a Polyacrylonitrile Membrane. Comparison of Enzyme Performances with Inorganic  
23 Beaded Supports*”, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1 Vol. 110, 2003, pp. 1-10].  
Metoda are dezavantajul că aminarea membranei este greu de realizat și o mare parte din  
25 grupele active sunt cuprinse în interiorul membranei, așadar enzima, care este voluminoasă,  
nu are acces spre acestea, pentru a reacționa. În plus, se utilizează ca activator o carbodiimidă,  
27 care este un produs scump.

O altă metodă cunoscută pentru obținerea de membrane de ultrafiltrare conținând  
29 enzime imobilizate covalent constă în utilizarea unui copolimer al acrilonitrilului cu glicidil  
metacrilat, urmată de tratarea membranei cu amoniac gazos sau soluție de amoniac, în vederea  
31 transformării grupelor epoxi ale glicidil metacrilatului în grupări aminice [US 6159370]. Metoda  
are dezavantajul că necesită utilizarea unui comonomer de mic tonaj, scump (glicidil meta-  
33 crilatul), iar enzima legată ulterior de grupările aminice se află prea aproape de suprafața  
hidrofobă a membranei și, prin urmare, nu-și poate adopta conformația optimă a centrului activ.

O altă metodă de obținere a membranelor conținând enzime imobilizate covalent se  
35 bazează pe utilizarea unei membrane comerciale de poliacrilonitril, pe care se depune un strat  
de alcool polivinilic care este parțial acetalizat cu glutardialdehidă, prin cataliză cu acid clorhidric  
37 [Stoyko Petrov, Todora Ivanova, Darinka Christova și Sijka Ivanova, “*Modification of  
39 polyacrylonitrile membranes with temperature sensitive poly(vinylalcohol-co-  
vinylacetal)*”, *Journal of Membrane Science* 261, 2005, pp. 1-6]. Metoda are dezavantajul  
41 că depunerea stratului de alcool polivinilic obturează porii membranei suport de poliacrilonitril,  
schimbând necontrolat caracteristicile de curgere prin membrană și că se ridică probleme de  
43 aderență între cele 2 straturi de polimeri.

Tot în documentele existente în stadiul tehnicii se cunoaște obținerea unei membrane  
45 polimerice ultrafiltrantă ce conține enzime imobilizate [GB 1474594], iar în brevetul RO 123276  
B1 se dezvoltă membrane polimerice conținând enzime imobilizate covalent, pe polimeri  
47 imprențați molecular cu aplicații în biosenzori enzimatici pentru poluanții din ape.

# RO 129706 B1

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unor membrane de micro și ultrafiltrare bicomponente, cu bune proprietăți mecanice și cu activitate enzimatică, preparate din amestec de copolimeri acrilonitril-co-acetat de vinil cu alcool polivinilic, dintr-o soluție într-un solvent comun al celor 2 polimeri, prin coagulare într-o baie de inversie de fază formată din doi componente, ambii nesolvenți pentru copolimerul acrilic, dar unul solvent pentru alcoolul polivinilic, urmată de activarea grupărilor OH ale alcoolului polivinilic prin reacție polimer analogă cu glutardialdehidă, astfel încât, pe de o parte, să se realizeze stabilizarea structurii membranei prin reticularea alcoolului polivinilic, iar pe de altă parte, să rămână grupări aldehidice nereacționate care să poată lega covalent grupările aminice ale enzimelor, fazele tehnologice și parametrii de lucru fiind astfel aleși încât se obțin caracteristicile compoziționale și structurale dorite, corespunzătoare domeniilor de utilizare ale membranelor acrilice de micro și ultrafiltrare bicomponente, conținând enzime legate covalent.

Membrana acrilică bicomponentă multifuncțională, cu enzime imobilizate covalent, conform invenției, este formată din 75...90% copolimer acrilic, 10...25% alcool polivinilic, și se utilizează ca suport pentru imobilizarea covalentă de 0,3...1% enzime, procentele fiind exprimate gravimetric.

Procedeele conform invenției înlătură dezavantajele procedeelelor menționate anterior prin aceea că se obține membrana acrilică bicomponentă de micro și ultrafiltrare pe bază de amestec de copolimeri acrilonitril-co-acetat de vinil și alcool polivinilic, conținând enzime imobilizate covalent, care se prepară pornind de la o soluție cu concentrația de 8...12% gravimetric amestec de polimeri în dimetilsulfoxid, amestecul de polimeri fiind format din 75...90% gravimetric copolimer statistic binar cu raportul masic 70...90 acrilonitril : 30...10 acetat de vinil, restul de 10...25% gravimetric din amestecul de polimeri fiind format din alcool polivinilic cu gradul de polimerizare de 1000...1500 și gradul de hidroliză de 99%, dizolvarea având loc la o temperatură de 80...95°C, timp de 2...10 h, până la dizolvarea completă a polimerilor, soluția polimerică astfel obținută fiind turnată pe o placă de sticlă și trasă cu un cuțit cu fantă de 200...300 μm, astfel încât să se formeze un film continuu de lichid, placa cu filmul de lichid fiind imediat imersată într-o baie de inversie de fază formată din amestec de 50...70% volumetric alcool izopropilic și restul apă distilată, unde se lasă timp de 1...2 h, la temperatura camerei, după care membrana obținută se desprinde de pe placa de sticlă, se clătește cu apă distilată timp de 1...2 min și se introduce într-un balon, în care se află o soluție apoasă conținând 10...20% volumetric soluție apoasă de glutardialdehidă 50% gravimetric și 1...2% volumetric H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrat 98%, raportul între membrana și soluția băii de funcționalizare fiind de 1:100...1:200 masă:volum, soluția de funcționalizare având o temperatură de 70...80°C, membrana menținându-se în soluția de funcționalizare, sub o agitare lentă, timp de 20...40 min, după care balonul cu membrana și soluția de funcționalizare se lasă să se răcească în aer liber timp de 10...15 min și apoi se scoate membrana din balon, se spală în 3 reprize cu apă demineralizată, fiecare repriză având o cantitate de apă aproximativ egală cu cantitatea de baie de funcționalizare, apoi membrana obținută este introdusă într-o baie de imobilizare formată din soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, conținând 0,3...1,0% o enzimă aleasă dintre lipază, tirozinază sau peroxidaza hreanului, unde se menține la o temperatură de 20°C, sub agitare, timp de 1...2 h, raportul între membrană și baia de imobilizare fiind de 1:50...1:70 masă:volum, după care membrana se spală cu apă demineralizată în 3 reprize, fiecare repriză utilizând o cantitate de apă egală cu cantitatea de soluție tampon folosită la prepararea băii de imobilizare, membrana spălată fiind apoi trecută într-o pungă de plastic, care se videază și se sigilează, și care este menținută în frigider, la o temperatură de +4...+8°C, până la utilizare.

# RO 129706 B1

- 1           Invenția prezintă următoarele avantaje:
- 2           - membranele multifuncționale prezintă, în același timp, proprietăți de micro sau ultra-  
3           filtrare și proprietăți mecanice și de cataliză enzimatică superioare, datorită compoziției  
4           copolimerului acrilic și datorită amestecului acestuia cu alcoolul polivinilic;
  - 5           - utilizează un copolimer acrilic format din doi comonomeri de mare tonaj, ceea ce  
6           asigură un preț de cost redus al copolimerului acrilic și, implicit, al membranei, introducerea  
7           drept comonomer a acetatului de vinil având ca efect creșterea modulului de elasticitate al  
8           membranei;
  - 9           - obținerea membranei dintr-o soluție a doi polimeri: copolimerul acrilic și alcoolul  
10          polivinilic asigură o mai bună omogenitate compozițională decât membranele dublu strat, fără  
11          ca alcoolul polivinilic să înfunde porii membranei;
  - 12          - membrana prezintă o hidrofilie mărită, datorită conținutului de alcool polivinilic, ceea  
13          ce asigură o mai bună compatibilitate între enzimă și membrană;
  - 14          - funcționalizarea membranei se realizează foarte ușor, prin reacția componentei de  
15          alcool polivinilic cu glutardialdehidă, care asigură concomitent și stabilizarea morfologiei  
16          membranei, prin reticulare;
  - 17          - utilizează o baie de inversie de faze bicomponentă, ceea ce asigură posibilitatea  
18          dirijării porozității membranei;
  - 19          - prin varierea compoziției unităților structurale de acrilonitril și acetat de vinil ale  
20          copolimerului și a cantității de alcool polivinilic, se pot dirija atât proprietățile de curgere ale  
21          membranelor de micro sau ultrafiltrare, cât și cantitatea de enzimă imobilizată;
  - 22          - deoarece imobilizarea se realizează pe grupările aldehidice nereacționate ale  
23          glutardialdehidei, enzima imobilizată se află la o distanță destul de mare de suprafața  
24          polimerului, ceea ce permite enzimei să-și aranjeze optim centrul activ și să aibă o activitate  
25          enzimatică ridicată;
  - 26          - utilizează pentru funcționalizare o substanță de uz industrial, relativ ieftină, precum  
27          soluția apoasă 50% de glutardialdehidă;
  - 28          - permite dirijarea activității enzimatice a membranelor, în funcție de gradul de  
29          funcționalizare al suprafeței acestora și în funcție de condițiile de lucru din etapa de imobilizare  
30          covalentă;
  - 31          - asigură, prin legăturile covalente, o imobilizare permanentă a enzimei pe polimer, ceea  
32          ce evită eluția enzimei în mediul de reacție.

33          Se dau, în continuare, exemple de realizare a invenției:

## 34          **Exemplul 1**

35          Într-un balon de sticlă cu 3 gâturi, cu capacitatea de 100 ml, se introduce cantitatea de  
36          41,8 ml (circa 46 g) dimetil sulfoxid și cantitatea de 1 g de alcool polivinilic (APV), având gradul  
37          de polimerizare 1500 și gradul de hidroliză 99,00%. Balonul se introduce într-o calotă electrică  
38          cu încălzire reglabilă. La gâtul central al balonului se montează un agitator de sticlă tip elice,  
39          la unul din gâturile laterale se introduce un termometru, iar la celălalt gât lateral se introduce un  
40          dop. Se pornește agitarea și încălzirea, astfel încât în balon să se mențină temperatura de 95°C,  
41          urmărind momentul în care toată cantitatea de alcool polivinilic s-a dizolvat. În acel moment, se  
42          scoate dopul rodat și prin gâtul lateral respectiv al balonului se introduce cantitatea de 3 g  
43          copolimer acrilonitril (AN) : acetat de vinil (AV) cu raportul masic AN:AV 90:10 și cu viscozitatea  
44          relativă (în soluție 0,3% în dimetilformamidă la 25°C) de 1,74. Se continuă agitarea până la  
45          dizolvarea completă a copolimerului acrilic, durata totală de dizolvare fiind de circa 6 h. Se  
46          obține astfel o soluție cu concentrația totală de polimer de circa 8% (gravimetric) și cu  
47          compoziția amestecului de polimeri de 75% (gravimetric) copolimer acrilic și 25% (gravimetric)  
48          APV.

# RO 129706 B1

Circa 5 ml din soluția proaspăt preparată se toarnă caldă pe o placă de sticlă cu dimensiunile: 400 x 500 x 4 mm și se întinde rapid cu un cuțit de tragere cu lungimea de 300 mm și fanta de 300 μm. Placa de sticlă cu filmul de lichid se imersează rapid într-o baie de inversie de fază, având temperatura camerei (circa +20°C), formată din 70% (volumetric) alcool izopropilic și restul apă distilată și conținută într-o cădiță de material plastic. Placa se lasă în baie din cădiță timp de 2 h. Apoi, membrana, cântărind circa 0,4 g, se desprinde de pe placa de sticlă, se clătește timp de 1 min cu un jet de apă distilată și se introduce într-un balon cu fund plat de 200 ml, cu 2 gâturi, amplasat într-o calotă cu încălzire electrică reglabilă, în care se află 80 ml soluție de funcționalizare, preparată prin adăugarea în apa distilată a 8 ml soluție apoasă 50% de glutardialdehidă și a 0,8 ml acid sulfuric 98% și baia de funcționalizare având temperatura de 70°C, indicată de termometrul amplasat pe gâtul lateral al balonului. Raportul dintre membrană și baia de funcționalizare este de circa 1:200 (masă:volum). La gâtul central se montează un agitator de sticlă, tip elice, și se pornește o agitare lentă, astfel încât să nu fie distrusă membrana. Se menține agitarea și încălzirea la temperatura de 70°C timp de 40 min. La finalul funcționalizării, se scoate balonul de funcționalizare din calota de încălzire și se lasă să se răcească în aer timp de 10 min. Apoi, membrana se scoate din balonul de funcționalizare și se trece într-un pahar Berzelius cu capacitatea de 200 ml, în care este spălată cu 3 porții de apă demineralizată, fiecare porție având cantitatea de 40 ml. Membrana spălată este introdusă într-un alt pahar Berzelius cu capacitatea de 200 ml și care conține 20 ml soluție 0,3% de lipază în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, unde se menține la temperatura camerei (20°C), sub agitare orbitală lentă, timp de 2 h, raportul între membrană și baia de imobilizare fiind de 1:50 (masă:volum), după care membrana se spală viguros cu apă demineralizată în 3 reprize, fiecare repriză utilizând o cantitate de apă de câte 20 ml. Membrana spălată este apoi trecută într-o pungă de plastic, care se videază și se sigilează, și care este menținută în frigider, la temperatura de +4...+8°C, până la utilizare. Membrana a prezentat un diametru mediu al porilor de 276 nm, un modul de elasticitate de 352 MPa și un conținut de lipază de 7,6% și care scade la 7,2% după 3 spălări cu câte 40 ml tampon fosfat 0,1 M, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei.

## Exemplul 2

Într-un balon de sticlă cu 3 gâturi, cu capacitatea de 100 ml, se introduce cantitatea de 40,0 ml (cca 44 g) dimetil sulfoxid și cantitatea de 0,6 g de alcool polivinilic, având gradul de polimerizare 1000 și gradul de hidroliză 99,30%. Balonul se introduce într-o calotă electrică cu încălzire reglabilă. La gâtul central al balonului se montează un agitator de sticlă tip elice, în unul din gâturile laterale se introduce un termometru, iar la celălalt gât lateral se introduce un dop. Se pornește agitarea și încălzirea, astfel încât în balon să se mențină temperatura de 80°C, urmărind momentul în care toată cantitatea de alcool polivinilic s-a dizolvat. În acel moment, se scoate dopul rodat și prin gâtul lateral respectiv al balonului se introduce cantitatea de 5,4 g copolimer acrilonitril : acetat de vinil cu raportul masic AN:AV 70:30 și cu viscozitatea relativă (în soluție 0,3% în dimetilformamidă la 25°C) de 1,50. Se continuă agitarea până la dizolvarea completă a copolimerului acrilic, durata totală de dizolvare fiind de circa 2 h. Se obține astfel o soluție cu concentrația totală de polimer de circa 12% (gravimetric) și cu compoziția amestecului de polimeri de 90% (gravimetric) copolimer acrilic și 10% (gravimetric) APV.

Circa 5 ml din soluția proaspăt preparată se toarnă caldă pe o placă de sticlă cu dimensiunile: 400 x 500 x 4 mm și se întinde rapid cu un cuțit de tragere cu lungimea de 300 mm și fanta de 200 μm. Placa de sticlă cu filmul de lichid se imersează rapid într-o baie de inversie de fază, având temperatura camerei, formată din 50% (volumetric) alcool izopropilic și restul apă distilată, și conținută într-o cădiță de material plastic. Placa se lasă în baie din cădiță timp de 1 h. Apoi, membrana, cântărind circa 0,4 g, se desprinde de pe placa de sticlă, se clătește timp

# RO 129706 B1

1 de 2 min cu un jet de apă distilată și se introduce într-un balon cu fund plat de 200 ml, cu  
2 gâturi, amplasat într-o calotă cu încălzire electrică reglabilă, în care se află 40 ml soluție de  
3 funcționalizare, preparată prin adăugarea în apă distilată a 8 ml soluție apoasă 50% de  
glutardialdehidă și a 0,4 ml acid sulfuric 98%), baia de funcționalizare având temperatura de  
5 80°C, indicată de termometrul amplasat pe gâtul lateral al balonului. Raportul între membrană  
și baia de funcționalizare este de circa 1:100 (masă:volum). La gâtul central se montează un  
7 agitator de sticlă, tip elice, și se pornește o agitare lentă, astfel încât să nu fie distrusă  
membrana. Se menține agitarea și încălzirea la temperatura de 80°C timp de 20 min. La finalul  
9 funcționalizării se scoate balonul de funcționalizare din calota de încălzire și se lasă să se  
răcească în aer timp de 15 min. Apoi, membrana se scoate din balonul de funcționalizare și se  
11 trece într-un pahar Berzelius cu capacitatea de 200 ml, în care este spălată cu 3 porții de apă  
demineralizată, fiecare porție având cantitatea de 80 ml. Membrana spălată este introdusă într-  
13 un alt pahar Berzelius cu capacitatea de 200 ml și care conține 28 ml soluție 1,0% de lipază în  
tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, unde se menține la temperatura camerei (20°C), sub agitare orbi-  
15 tală lentă, timp de 1 h, raportul între membrană și baia de imobilizare fiind de 1:70  
(masă:volum), după care membrana se spală viguros cu apă demineralizată în 3 reprize, fiecare  
17 repriză utilizând o cantitate de apă de câte 28 ml. Membrana spălată este apoi trecută într-o  
pungă de plastic, care se videază și se sigilează, și care este menținută în frigider, la  
19 temperatura de +4...+8°C, până la utilizare. Membrana a prezentat un diametru mediu al porilor  
de 98 nm, un modul de elasticitate de 366 MPa și un conținut de lipază de 4,8% și care scade  
21 la 4,4% după 3 spălări cu câte 40 ml tampon fosfat 0,1 M, dovedind imobilizarea covalentă a  
enzimei.

### 23 Exemplul 3

Într-un balon de sticlă cu 3 gâturi, cu capacitatea de 100 ml, se introduce cantitatea de  
25 40,9 ml (circa 45 g) dimetil sulfoxid și cantitatea de 0,75 g de alcool polivinilic, având gradul de  
polimerizare 1200 și gradul de hidroliză 99,40%. Balonul se introduce într-o calotă electrică cu  
27 încălzire reglabilă. La gâtul central al balonului se montează un agitator de sticlă tip elice, la unul  
din gâturile laterale se introduce un termometru, iar la celălalt gât lateral se introduce un dop.  
29 Se pornește agitarea și încălzirea, astfel încât în balon să se mențină temperatura de 85°C,  
urmărind momentul în care toată cantitatea de alcool polivinilic s-a dizolvat. În acel moment, se  
31 scoate dopul rodat și prin gâtul lateral respectiv al balonului se introduce cantitatea de 4,25 g  
copolimer acrilonitril : acetat de vinil cu raportul masic AN:AV 80:20 și cu viscozitatea relativă  
33 (în soluție 0,3% în dimetilformamidă la 25°C) de 2,20. Se continuă agitarea până la dizolvarea  
completă a copolimerului acrilic, durata totală de dizolvare fiind de circa 10 h. Se obține astfel  
35 o soluție cu concentrația totală de polimer de circa 10% (gravimetric) și cu compoziția ames-  
tecului de polimeri de 85% (gravimetric) copolimer acrilic și 15% (gravimetric) APV.

37 Circa 5 ml din soluția proaspăt preparată se toarnă caldă pe o placă de sticlă cu  
dimensiunile 400 x 500 x 4 mm și se întinde rapid cu un cuțit de tragere cu lungimea de 300 mm  
39 și fanta de 250 μm. Placa de sticlă cu filmul de lichid se imersează rapid într-o baie de inversie  
de fază, având temperatura camerei (circa +20°C), formată din 60% (volumetric) alcool  
41 izopropilic și restul apă distilată și conținută într-o cădiță de material plastic. Placa se lasă în  
baia din cădiță timp de 1,5 h. Apoi, membrana, cântărind circa 0,35 g, se desprinde de pe placa  
43 de sticlă, se clătește timp de 1 min cu un jet de apă distilată și se introduce într-un balon cu fund  
plat, de 200 ml, cu 2 gâturi, amplasat într-o calotă cu încălzire electrică reglabilă, în care se află  
45 60 ml soluție de funcționalizare, preparată prin adăugarea în apă distilată a 9 ml soluție apoasă  
50% de glutardialdehidă și a 0,9 ml acid sulfuric 98% și baia de funcționalizare având tempe-  
47 ratura de 75°C, indicată de termometrul amplasat pe gâtul lateral al balonului. Raportul între  
membrană și baia de funcționalizare este de circa 1:171 (masă:volum). La gâtul central se

# RO 129706 B1

montează un agitator de sticlă, tip elice, și se pornește o agitare lentă, astfel încât să nu fie 1  
distrusă membrana. Se menține agitarea și încălzirea la temperatura de 75°C timp de 30 min. 2  
La finalul funcționalizării se scoate balonul de funcționalizare din calota de încălzire și se lasă 3  
să se răcească în aer timp de 12 min. Apoi, membrana se scoate din balonul de funcționalizare 4  
și se trece într-un pahar Berzelius cu capacitatea de 200 ml, în care este spălată cu 3 porții de 5  
apă demineralizată, fiecare porție având cantitatea de 60 ml. Membrana spălată este introdusă 6  
într-un alt pahar Berzelius cu capacitatea de 200 ml și care conține 21 ml soluție 0,5% de lipază 7  
în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7, unde se menține la temperatura camerei (20°C), sub agitare 8  
orbitală lentă, timp de 1,5 h, raportul între membrană și baia de imobilizare fiind de 1:60 9  
(masă:volum), după care membrana se spală viguros cu apă demineralizată în 3 reprize, fiecare 10  
repriză utilizând o cantitate de apă de câte 21 ml. Membrana spălată este apoi trecută într-o 11  
pungă de plastic, care se videază și se sigilează, și care este menținută în frigider, la 12  
temperatura de +4...+8°C, până la utilizare. Membrana a prezentat un diametru mediu al porilor 13  
de 325 nm, un modul de elasticitate de 358 MPa și un conținut de lipază de 6,4% și care scade 14  
la 5,9% după 3 spălări cu câte 40 ml tampon fosfat 0,1 M, dovedind imobilizarea covalentă a 15  
enzimei.

## Exemplul 4

Se procedează ca în exemplul 1, cu excepția faptului că în loc de lipază se folosește 17  
tirozinază. Membrana a prezentat un diametru mediu al porilor de 288 nm, un modul de 18  
elasticitate de 347 MPa și un conținut de tirozinază de 6,8%, care scade la 6,5% după 3 spălări 19  
cu câte 40 ml tampon fosfat 0,1 M, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei. 21

## Exemplul 5

Se procedează ca în exemplul 2, cu excepția faptului că în loc de lipază se folosește 23  
tirozinază. Membrana a prezentat un diametru mediu al porilor de 88 nm, un modul de 24  
elasticitate de 377 MPa și un conținut de tirozinază de 5,8%, care scade la 5,5% după 3 spălări 25  
cu câte 40 ml tampon fosfat 0,1 M, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei.

## Exemplul 6

Se procedează ca în exemplul 3, cu excepția faptului că în loc de lipază se folosește 27  
tirozinază. Membrana a prezentat un diametru mediu al porilor de 318 nm, un modul de 28  
elasticitate de 357 MPa și un conținut de tirozinază de 7,0%, care scade la 6,6% după 3 spălări 29  
cu câte 40 ml tampon fosfat 0,1 M, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei. 31

## Exemplul 7

Se procedează ca în exemplul 1, cu excepția faptului că în loc de lipază se folosește 33  
peroxidaza hreanului. Membrana a prezentat un diametru mediu al porilor de 263 nm, un modul 34  
de elasticitate de 355 MPa și un conținut de peroxidaza de 4,8%, care scade la 4,5 % după 35  
3 spălări cu câte 40 ml tampon fosfat 0,1 M, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei.

## Exemplul 8

Se procedează ca în exemplul 2, cu excepția faptului că în loc de lipază se folosește 37  
peroxidaza hreanului. Membrana a prezentat un diametru mediu al porilor de 92 nm, un modul 38  
de elasticitate de 362 MPa și un conținut de peroxidaza de 6,5%, care scade la 6,2% după 3  
spălări cu câte 40 ml tampon fosfat 0,1 M, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei. 41

## Exemplul 9

Se procedează ca în exemplul 3, cu excepția faptului că în loc de lipază se folosește 43  
peroxidaza hreanului. Membrana a prezentat un diametru mediu al porilor de 296 nm, un modul 44  
de elasticitate de 369 MPa și un conținut de peroxidaza de 6,7%, care scade la 6,2% după 45  
3 spălări cu câte 40 ml tampon fosfat 0,1 M, dovedind imobilizarea covalentă a enzimei.

## Revendicări

1  
3 1. Membrană acrilică bicomponentă multifuncțională, cu enzime imobilizate covalent,  
5 **caracterizată prin aceea că** este formată din 75...90% copolimer acrilic, 10...25% alcool  
6 polivinilic, și se utilizează ca suport pentru imobilizarea covalentă de 0,3...1% enzime, pro-  
7 centele fiind exprimate gravimetric.

7 2. Membrană conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** respectivul copoli-  
8 merul acrilic este un copolimer statistic binar acrilonitril : acetat de vinil cu raportul masic de  
9 70:30...90:10 și viscozitatea relativă, în soluție 0,3% în dimetilformamidă la o temperatură de  
10 25°C, de 1,50...2,20, iar alcoolul polivinilic are gradul de polimerizare de 1000...1500 și gradul  
11 de hidroliză de peste 99%.

12 3. Membrană conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** enzimele imobilizate  
13 covalent sunt alese dintre lipaza, tirozinaza și peroxidaza hreanului.

14 4. Procedeu de obținere a membranei acrilice bicomponentă multifuncțională, conținând  
15 enzime imobilizate covalent, definită în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** se prepară  
16 pornind de la o soluție cu concentrația gravimetrică de 8...12% amestec de polimeri în  
17 dimetilsulfoxid, amestecul de polimeri fiind format din 75...90% gravimetric copolimer statistic  
18 binar cu raportul masic de 70...90 acrilonitril : 30...10 acetat de vinil, restul de 10...25% gravi-  
19 metrice din amestecul de polimeri fiind format din alcool polivinilic cu gradul de polimerizare  
20 1000...1500 și gradul de hidroliză de peste 99%, dizolvarea având loc la o temperatură de  
21 80...95°C, timp de 2...10 h, până la dizolvarea completă a polimerilor, soluția polimerică astfel  
22 obținută fiind turnată pe o placă de sticlă și trasă cu un cuțit cu fantă de 200...300 μm, astfel  
23 încât să se formeze un film continuu de lichid, placa cu filmul de lichid fiind imediat imersată într-  
24 o baie de inversie de fază formată din amestec volumetric de 50...70% alcool izopropilic și restul  
25 apă distilată, unde se lasă timp de 1...2 h, la temperatura camerei, după care membrana  
26 obținută se desprinde de pe placa de sticlă, se clătește cu apă distilată timp de 1...2 min și se  
27 introduce într-un balon, în care se află 10...20% volumetric soluție apoasă de glutardialdehidă  
28 50% gravimetrice și 1...2% volumetric H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrat 98%, raportul masă:volum între  
29 membrană și soluția băii de funcționalizare fiind de 1:100...1:200, soluția de funcționalizare  
30 având o temperatură de 70...80°C, membrana se menține, în soluția de funcționalizare, sub o  
31 agitare lentă, timp de 20...40 min, după care balonul cu membrana și soluția de funcționalizare  
32 se lasă să se răcească în aer liber timp de 10...15 min, apoi se scoate membrana din balon, se  
33 spală în 3 reprize cu apă demineralizată, fiecare repriză având o cantitate de apă egală cu  
34 cantitatea de baie de funcționalizare, apoi membrana obținută este introdusă într-o baie de  
35 imobilizare formată din soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7 conținând 0,3...1,0% o enzimă  
36 aleasă dintre lipază, tirozinază sau peroxidaza hreanului unde se menține la o temperatură de  
37 20°C, sub agitare, timp de 1...2 h, raportul masă:volum între membrană și baia de imobilizare  
38 fiind de 1:50...1:70, după care membrana se spală cu apă demineralizată în 3 reprize, fiecare  
39 repriză utilizând o cantitate de apă egală cu cantitatea de soluție tampon folosită la prepararea  
40 băii de imobilizare, membrana spălată fiind apoi trecută într-o pungă de plastic, care se vedează  
41 și se sigilează și care este menținută în frigider, în intervalul de temperatură de +4°C...+8°C,  
până la utilizare.

