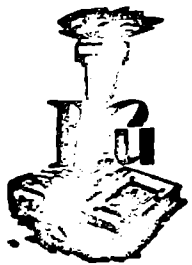


ELENA POPA

ALEXANDRU GIOABĂ

**BIOCATALIZATORI
IMOBILIZAȚI ÎN SINTEZA
UNOR SUBSTANȚE BIOACTIVE**

EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI
1999

| | |
|--|--|
|  | BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARA București |
| | Cota <i>IV 516 383</i> Inventar <i>C199903848</i> |

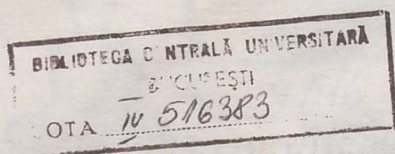
1999

ELENA POPA

ALEXANDRU GIOABĂ

**BIOCATALIZATORI
IMOBILIZAȚI ÎN SINTEZA
UNOR SUBSTANȚE BIOACTIVE**

**EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI
1999**



Referenți științifici: Prof. dr. ADALGIZA CIOBANU
Prof. dr. OVIDIU MAIOR

456/94

B.C.U. București



C199903848

© Editura Universității din București
Șos. Panduri, 90-92, București - 76235; Telefon/Fax 410.23.84

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale

POPA, ELENA

Biocatalizatori imobilizați în sinteza unor substanțe
bioactive / Elena Popa, Alexandru Gioabă

București: Editura Universității din București, 1999

136 p.; il.; 29 cm.

Bibliogr.

ISBN 973-575-307-3

I. Gioabă, Alexandru

577.15(075.8)

CUPRINS

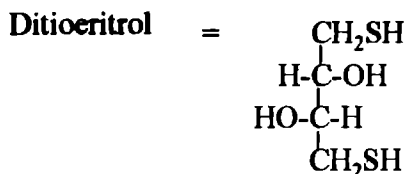
| | Pag |
|--|-----------|
| I. TIPURI DE SUPORTURI PENTRU IMOBILIZAREA BIOCATALIZATORILOR | 1 |
| I.1. Perlarea agarozei și alcoolului polivinilic | 3 |
| I.2. Reticularea suporturilor polihidroxicice (agaroză, amidon, alcool polivinilic etc.) | 4 |
| I.3. Determinarea unor parametri caracteristici ai gelurilor-suporturi | 7 |
| I.3.1. Determinarea umidității suportului | 7 |
| I.3.2. Determinarea capacității de îmbibare | 7 |
| I.3.3. Volumul de umflare (gonflare) | 9 |
| I.3.4. Viteza de curgere prin coloană | 9 |
| I.4. Activarea suporturilor polihidroxicice | 9 |
| I.4.1. Activarea agarozei cu bromcian | 10 |
| I.4.1.1. Introducere de brațe amino-terminale pe suporturile hidroxicice activate cu BrCN | 13 |
| I.4.1.2. Introducerea de brațe carboxi-terminale pe suporturile polihidroxicice activate | 17 |
| I.4.2. Activarea suporturilor polihidroxicice cu <i>p</i> -chinonă | 19 |
| I.4.2.1. Activarea Sepharozei 6B | 20 |
| I.4.2.2. Activarea amidonului | 21 |
| I.4.3. Activarea suporturilor polihidroxicice prin metoda izocianatilor | 21 |
| I.4.4. Activarea polizaharidelor prin oxidare cu NaIO ₄ | 23 |
| I.4.5. Activarea suporturilor polihidroxicice prin transformare în hexil-eteri | 24 |
| I.4.6. Activarea agarozei prin introducerea grupei disulfură | 25 |
| I.4.7. Activarea suporturilor polihidroxicice cu bisoxirani | 28 |
| I.5. Obținerea unor celuloze modificate | 29 |
| I.5.1. Prepararea 2-amino-4,6-diclor- <i>s</i> -triazinei | 30 |
| I.5.2. Prepararea aminoclor- <i>s</i> -triazinil-derivaților celulozei și celulozelor modificate | 31 |
| I.6. Metode de activare a dextranilor | 32 |
| I.6.1. Activarea dextranilor cu BrCN | 32 |
| I.6.2. Activarea Sephadexului G-200 cu BrCN | 33 |
| I.6.3. Activarea Sephadexului G-50 cu BrCN | 33 |
| I.6.4. Activarea Sephadexului 200 cu BrCN | 34 |
| II. METODE DE IMOBILIZARE A UNOR BIOCATALIZATORI | 35 |
| II.1. Imobilizarea invertazei | 35 |
| II.1.1. Imobilizarea invertazei pe cărbune activ | 35 |
| II.1.2. Imobilizarea invertazei prin legare ionică pe un suport-schimbător de ioni | 39 |
| II.1.3. Imobilizarea invertazei prin reticulare | 40 |

| | Pag |
|---|-----|
| II.1.3.1.Coreticularea invertazei cu BSA (serum albumină bovină) | 41 |
| II.1.3.2.Coreticularea invertazei cu gelatina | 41 |
| II.1.4.Interpretarea și compararea variației activității enzimatice a invertazei imobilizate prin metodele descrise | 42 |
| II.2.Metode de imobilizare a ureazei | 42 |
| II.2.1.Imobilizarea ureazei pe gelatină | 43 |
| II.2.2.Imobilizarea ureazei prin coreticulare cu glutaraldehidă pe BSA | 43 |
| II.2.3.Imobilizarea ureazei pe colagen | 44 |
| II.2.3.1.Co-reticularea ureazei cu colagenul | 45 |
| II.2.3.2.Determinarea cantității de enzimă legată pe colagen | 46 |
| II.2.4.Determinarea activității ureazei imobilizate în funcție de concentrația substratului | 48 |
| II.2.5.Aprecieri comparative | 50 |
| II.3.Metode de imobilizare a chimotripsinei | 51 |
| II.3.1.Imobilizarea chimotripsinei pe agaroză și agaroză activată | 51 |
| II.3.1.1.Imobilizarea pe gel de agaroză 2% activat cu oxirani | 51 |
| II.3.1.2.Imobilizare pe Sepharoză 6B activată cu <i>p</i> -benzochinonă | 51 |
| II.3.2.Imobilizarea chimotripsinei pe celuloze modificate cu <i>s</i> -triazine | 52 |
| II.3.3.Imobilizarea chimotripsinei prin reticulare cu glutaraldehidă | 53 |
| II.3.3.1.Reticularea directă | 53 |
| II.3.3.2.Co-reticularea chimotripsinei cu aminoetilceluloză (AEC) și glutaraldehidă | 54 |
| II.3.4.Determinarea activității chimotripsinei libere și imobilizate | 55 |
| II.4.Imobilizarea pepsinei pe agaroză aminată | 56 |
| II.5.Imobilizarea β -amilazei pe oxoagaroză, cu ciclohexilizocianat | 57 |
| II.6.Imobilizarea amilo-1,6-glucozidazei pe gel de mercaptoagaroză activat | 58 |
| II.7.Imobilizarea unor biocatalizatori prin encapsulare | 60 |
| II.8.Metode de imobilizare a tripsinei | 62 |
| II.8.1.Imobilizarea prin coreticulare cu glutaraldehidă pe aminoetilceluloză (AEC) | 62 |
| II.8.2.Imobilizarea tripsinei prin legare covalentă pe alcool polivinilic reticulat | 63 |
| II.8.3.Determinarea activității proteolitice a tripsinei imobilizate | 64 |
| II.8.4.Determinarea cromatografică a activității tripsinei imobilizate | 69 |
| II.9.Imobilizarea fosfatazei alcaline | 71 |
| II.9.1.Imobilizarea fosfatazei alcaline pe alcool polivinilic activat cu BrCN | 71 |
| II.9.2.Determinarea activității enzimatice a fosfatazei libere și imobilizate | 71 |
| II.9.3.Determinarea temostabilității fosfatazei alcaline imobilizate | 73 |
| II.10.Imobilizarea glucozoxidazei | 74 |

| | Pag |
|---|-----|
| II.11.Imobilizarea celulelor de <i>Saccaromyces cerevisiae</i> prin includere în geluri insolubile | 76 |
| II.11.1.Imobilizarea celulelor de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> în alginat de calciu | 77 |
| II.11.2.Determinarea activității enzimatică a drojdiei libere și incluse în alginat | 77 |
| II.11.3.Co-imobilizarea drojdiei de brutărie și a β -galactozidazei în gelul de alginat de calciu | 78 |
| II.12.Imobilizarea celulelor de <i>Streptomyces simplex</i> pe colagen | 80 |
| II.12.1.Imobilizarea celulelor de <i>Streptomyces</i> sp prin corecturare cu colagen | 81 |
| | 82 |
| III.UTILIZĂRI ALE UNOR BIOCATALIZATORI LIBERI ȘI IMOBILIZAȚI | |
| III.1.Scindări de amestecuri racemice | 82 |
| III.1.1.Scindarea enantiospecifică a <i>D,L</i> -triptofanului | 83 |
| III.1.2.Scindarea <i>DL</i> -tirozinei | 86 |
| III.1.3.Scindarea <i>D,L</i> -fenilalaninei | 89 |
| III.2.Obținerea acidului 6-aminopenicilanic | 93 |
| III.3.Izolarea inhibitorului natural al tripsinei prin cromatografie afină | 95 |
| III.3.1.Obținerea extractului de cartofi cu conținut în inhibitor al tripsinei | 95 |
| III.3.2.Izolarea inhibitorului tripsinei prin cromatografie afină | 96 |
| III.3.3.Determinarea activității inhibitorului tripsinei izolat prin cromatografie afină | 97 |
| III.4.Dozarea activității unor enzime cu ajutorul substratelor cromogene | 98 |
| III.4.1.Metoda generală de obținere a substratelor cromogene pentru dozarea α -amilazei | 101 |
| III.4.2.Determinarea activității enzimatică a α -amilazei | 101 |
| III.4.2.1.Metoda colorimetrică | 102 |
| III.4.2.2.Determinarea activității α -amilazei prin metoda gel-difuziei radiale | 104 |
| ANEXA NR.1 | 105 |
| ANEXA NR.2 | 106 |
| ANEXA NR.3 | 107 |
| ANEXA NR.4 | 108 |
| ANEXA NR.5 | 111 |
| ANEXA NR.6 | 112 |
| ANEXA NR.7 | 113 |
| ANEXA NR.8 | 114 |
| ABREVIERI, DENUMIRI DIVERSE | 123 |
| BIBLIOGRAFIE | 125 |

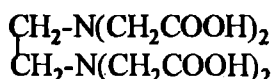
ABREVIERI, DENUMIRI DIVERSE

- AEC** = aminoetilceluloză
- Amberlit** = rășini sintetice, schimbătoare de ioni bazice (IRC) și acide (IRA) – Rohm and Haas Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA
- BAEE** = esterul etilic al *N*-benzoilargininei
- BSA** = serum albumină bovină
- CMC** = carboximetil-celuloză
- DCC** = dicitlohexilcarbodiimida: $C_6H_{11}N=C=NC_6H_{11}$
- DEAE** = dietilaminoetil (-Sephadex, -Sepharoză, -celuloză etc.)



- EDC** = 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă:
- $$C_2H_5-N=C=N-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$$

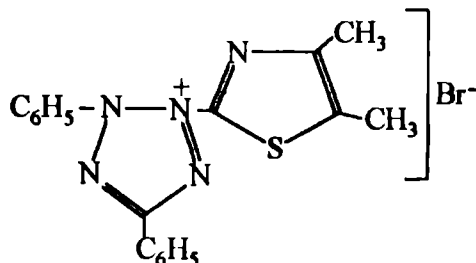
- EDTA** = acid etilendiamino-tetraacetic:



- Fenazin-metosulfat A** = metilsulfat de *S*-metil-fenaziniu:



- MTT** = bromură de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazoliniu:



- PVA** = alcool polivinilic
- Sephadex** = gel perlat de dextran, reticulat cu epiclорhidrină (Pharmacia Fine Chemicals Inc.)
- Sepharoză** = gel perlat de agaroză, de concentrații diferite: 2B, 4B, 6B etc. (Pharmacia Fine Chemicals Inc.)

TEE =esterul etilic al tirozinei

TRIS =trihidroximetilamino-metan: $(\text{HOCH}_2)_3\text{-C-NH}_2$

Vionit CS =rășină schimbătoare de ioni acidă (copolimer stiren-divinilbenzen cu grade diferite de sulfonare)

CUVÂNT ÎNAINTE

Biocatalizatorii imobilizați reprezintă un domeniu modern al Biochimiei, atât în cercetare cât și aplicativ, chiar la scară industrială. Astfel, în industria alimentară și cea farmaceutică, procedeele biochimice înlocuiesc treptat metodele chimice, energofage, poluante și costisitoare. Biosensorii cu enzime imobilizate cunosc de asemenea o răspândire din ce în ce mai mare în industrie și în medicină.

De suporturile solide insolubile, naturale și sintetice, pot fi asociate prin diverse tipuri de interacții (legături covalente, ionice, adsorbție fizică etc.) enzime, celule active, celule moarte etc.

În această carte de lucrări practice sunt tratate în special enzimele imobilizate.

Față de enzimele libere, utilizarea enzimelor imobilizate prezintă avantaje substanțiale, cum sunt: enzimele imobilizate pot fi folosite de repetate ori pentru aceeași reacție în timp ce enzimele libere – doar o singură dată; separarea și purificarea produșilor de reacție sunt mai ușoare și mai economice; stabilitatea crescută a enzimelor după imobilizare; posibilitatea efectuării unor reacții multisevențiale și chiar a unor cicluri metabolice complete; reducerea dimensiunilor instalațiilor și a poluării mediului, scăderea costurilor de producție etc.

Pentru o prezentare coerentă, materialul cuprins în lucrare a fost sistematizat în concordanță cu problematica propusă, legată de activitatea de laborator a studenților bichimiști care frecventează cursurile de aprofundare (masterat) din Facultatea de Chimie.

În același timp, cartea poate fi utilă și în pregătirea practică a celor care vor să se inițieze, dar și ca material documentar pentru cei care lucrează în problemele de profil.

Extinderea continuă a procedeelelor biotehnologice, analitice și de cercetare bazate pe biocatalizatori imobilizați, ne-a determinat să întocmim această carte de lucrări practice, având în vedere că până acum la noi în țară nu s-a mai publicat un astfel de material.

Ne exprimăm cu anticipație recunoștința pentru cei care ne vor oferi sugestii, observații sau critici menite a îmbunătăți conținutul prezentei lucrări, în vederea unei eventuale ediții ulterioare.

Autorii

BIOCATALIZATORI IMOBILIZAȚI ÎN SINTEZA UNOR SUBSTANȚE BIOACTIVE

LTIPURI DE SUPORTURI PENTRU IMOBILIZAREA BIOCATALIZATORILOR

Biocatalizatorii imobilizați pe suporturi insolubile se folosesc astăzi pe scară largă într-o serie de domenii ca: fabricarea medicamentelor de sinteză și de semisinteză, industria alimentară, cosmetică, determinări biochimice și analitice, terapie medicală, imunologie, epurarea apelor, aerului și solului etc. Trecerea de la utilizarea enzimelor native (solubile) la aducții obținute prin fixarea acestora pe suporturi și introduși în bioreactoare a reprezentat o adevărată revoluție în planul dezvoltării bioindustrii, mai economică și mult mai puțin poluantă în comparație cu industria chimică tradițională.

Avantajele utilizării imobilizatelor (aducțiilor, agregatelor) de enzime sunt multiple, în comparație cu procedeele bazate pe enzime native (libere, solubile):

- separarea și purificarea enzimelor din sursele naturale este un proces laborios și costisitor (mai ales în cazul enzimelor intracelulare). De aceea, procesele bazate pe enzimele solubile prezintă dezavantajul major al unei unice utilizări, la sfârșitul reacției enzima fiind îndepărtată;

- dacă produsul de reacție nu este bine purificat, urme de enzimă pot declanșa reacții imunologice în cazul în care compusul este folosit pentru obținerea sau condiționarea materialelor fiziologic-active (medicamente, cosmetice, alimente etc.);

- procesele bazate pe enzime solubile sunt discontinue;

- prețul de cost al produșilor obținute astfel este ridicat.

Dacă însă enzima este imobilizată prin legături fizice sau chimice (covalente) pe un suport insolubil în mediul de reacție, imobilizatul obținut prezintă avantaje deosebite ca:

- posibilitatea utilizării aceleiași cantități de enzimă pentru un număr mare (de ordinul zecilor sau sutelor de ori) de reacții de același tip;

- posibilitatea regenerării suportului și reactivării enzimei;

- eliminarea etapelor intermediare de izolare și purificare a produșilor de reacție, ceea ce face ca procesul să devină continuu și să poată fi automatizat, randamentele fiind ridicate;

- puritatea înaltă a produșilor de reacție;

- posibilitatea de a se lucra nu numai cu enzime purificate dar și cu celule, culturi celulare viabile, organite celulare sau extracte celulare brute imobilizate;

- scăderea prețului de fabricație al unor compuși cu acțiune biologică, de importanță vitală;

-posibilitatea realizării unor reacții multisevențiale, necesitând un număr mare de enzime și coenzime co-imobilizate a permis reproducerea pe scară industrială, în industria alimentară, a unor cicluri metabolice complete ca fermentațiile.

Unele dintre cele mai accesibile și mai des utilizate suporturi pentru imobilizarea biocatalizatorilor (enzime, organite celulare, celule, extracte celulare etc.) sunt cele de tip polihidroxilic, atât naturale (polizaharide ca: amidon, amidon modificat, celuloză, celuloză modificată, dextransi de tip Sephadex, alginat, k-carageenan, chitosan etc.) cât și cele sintetice (alcool polivinilic, polihidroxialchil-acriilați și –metacriilați etc.).

Aceste materiale pot fi folosite atât pentru imobilizarea fizică a biocatalizatorilor (adsorbție, includere în geluri, encapsulare, fixare pe membrane semipermeabile etc.) cât și pentru imobilizarea chimică prin legături covalente enzimă-suport.

Suporturile cu structură polihidroxilică sunt preferate altor materiale (cărbune, ceramică, alumina, silice, nylon, collagen etc.), deoarece sunt ușor de funcționalizat (activat) prin diverse metode care urmăresc introducerea pe suprafața lor a unor grupe reactive (imidocarbonat, halogen reactiv, duble legături activate etc.), capabile de a fixa covalent proteinele.

În plus, aceste suporturi sunt poroase, ușor de transformat în geluri stabile, insolubile în apă și pot fi condiționate într-o mare varietate de forme: particule sferice (perle), microcapsule, fire și fibre, membrane, plăci, tuburi, discuri etc., cu care se poate lucra atât în instalații de laborator cât și în bioreactoare industriale. Pe de altă parte, dacă suporturile polihidroxilice naturale (în special amidonul și amidonul modificat) sunt sensibile la acțiunea microorganismelor, acest dezavantaj este absent în cazul polimerilor sintetici, mult mai puțin biodegradabili în condițiile de lucru și de stocare.

Nu există metode universale de imobilizare pentru fiecare tip de biocatalizatori, alegerea suporturilor și metodelor de fixare făcându-se în urma unor determinări empirice. Se aleg acele procedee pentru care activitatea biocatalitică a aducțiilor suport-enzimă ("activitate remanentă") este cât mai apropiată de cea a enzimei native (considerată convențional a fi 100%) în condiții similare (substrat, tip de reacție, parametri de lucru etc.).

La alegerea suporturilor și metodelor de imobilizare se iau în calcul:

-stabilitatea aducțiilor la variații de pH, temperatură, salinitate, timp și în general în condițiile în care urmează să fie utilizați;

-posibilitatea de regenerare a suportului și de reactivare a enzimei după un număr de reacții efectuate cu aductul;

-factorii economici (accesibilitatea și costul suportului, reactivilor și metodelor de imobilizare, stabilitate operațională în timp a aducțiilor, dimensiunile instalațiilor etc.).

Polizaharidele rămân cele mai atractive suporturi din punct de vedere economic, al accesibilității și al biocompatibilității lor, fiind preferate altor materiale.

Pentru a asigura suporturilor forma sferică, perlată (care oferă suprafață maximă de contact suport-enzimă și ulterior aduct-substrat), dimensiuni ale particulelor și o porozitate satisfăcătoare care să reducă la minim efectele împiedicării difuziei externe (Nernst) și interne ale substratului și produsului de reacție la și de la centrul activi ai biocatalizatorului, materialele suport se supun mai întâi operației de perlare.

Particulelor perfect sferice și insolubile astfel obținute pot fi utilizate atât în instalațiile de laborator cât și în bioreactoare de tip coloană (cu pat compact sau fluidizat), de tip "batch" (vas cu agitare) ca și în cromatografia de afinitate (afină), pentru purificarea sau izolarea unor compuși biologic-activi (enzime și alte proteine, inhibitori enzimatici, anticorpi și antigene etc.).

În cele ce urmează se vor descrie câteva exemple de perlare și activare a suporturilor polihidroxicile.

I.1. Perlarea agarozel și alcoolului polivinilic

Pentru obținerea unor particule sferice de gel-suport se utilizează metoda precipitării prin schimbarea solventului:

A. Obținerea unui gel perlat de agaroză 6% (de tip Sepharoză 6B)

Materiale necesare:

- agaroză 18g;
- toluen 450ml;
- CCl₄ 150ml;
- emulgator de tip "apă în ulei" (stearat de calciu, o sare de amoniu cuaternar etc. 1-2g sau nonilfenol polietoxilat cu 4 moli de etilenoxid 3-4ml);
- eter etilic 500ml.

Mod de lucru:

Într-un balon de 750ml prevăzut cu agitator mecanic (ancoră) se dizolvă, la cald, pe baie de apă și sub o bună agitare, 18g agaroză în 300ml apă distilată ("faza apoasă").

Separat, într-un balon de 1000ml cu trei găuri, prevăzut cu agitator mecanic și refrigerent ascendent, se omogenizează prin agitare 450ml toluen și 150ml tetraclorură de carbon. Amestecul obținut se încălzește pe o baie de apă, până la 50-55°C ("faza organică").

"Faza apoasă" se răcește sub agitare la 50°C, după care se adaugă în jet continuu la "faza organică" încălzită. Pentru stabilizarea emulsiei formate se adaugă la aceasta din urmă 1-2g stearat de calciu sau alt emulgator solid dizolvat într-o cantitate minimă de amestec toluen-CCl₄ (3:1 v/v) sau 3-4ml emulgator lichid.

După 2-3 minute de agitare, emulsia se răcește într-o baie de apă cu gheață, sub agitare, până la solidificarea perlelor de gel (5-8 minute).

Agitarea emulsiei nu trebuie să fie nici prea energică, nici prea îndelungată pentru a nu provoca spargerea perlelor și obținerea unor particule de dimensiuni foarte mici care se pot tasa (compacta) ușor în reactoarele-coloană. Din același motiv nu se vor utiliza agitatoare cu lame care pot tăia perlele de agaroză.

Gelul perlat se separă prin filtrare pe o pâlnie cu masă filtrantă și se spală pe pâlnie de 5 ori cu câte 100ml eter etilic (pentru îndepărtarea "fazei organice") și apoi cu 200-300ml apă distilată. Resturile de eter etilic se îndepărtează prin încălzirea moderată a suportului perlat, într-un exicator, la vid, la 30-37°C. Gelul perlat se examinează la microscop. Se păstrează în apă distilată.

B.Cernerea selectivă a gelului perlat de agaroză

Perlele de gel obținute după procedeul descris anterior nu au toate același diametru. Pentru a le separa în funcție de mărimea lor, se poate proceda (grosier) la plasarea perlelor într-un cilindru gradat, urmată de decantări succesive, la anumite intervale de timp necesare sedimentării lor.

O metodă mai eficientă este sortarea prin cernere pe site metalice cu ochiuri de mărimi diferite. În tabelul nr.1 este indicată o baterie de patru site cu ochiuri de diverse dimensiuni medii.

Tabelul nr.1

Baterie de site pentru sortarea a 370ml de gel perlat de agaroză

| Sita nr. | Dimensiunile ochiurilor sitei | | ml agaroză perlată obținută |
|----------|-------------------------------|--------|-----------------------------|
| | mm | mesh | |
| 1 | 0,8 | 10-20 | 2,1 |
| 2 | 0,5 | 20-35 | 325 |
| 3 | 0,31 | 35-50 | 29 |
| 4 | 0,16 | 50-100 | 13 |

Cernerea se începe de la sita cu ochiurile cele mai mari, antrenând perlele de gel cu un jet de apă (nu prea puternic) de la robinet, urmând apoi cernerea pe celelate site, cu ochiuri de dimensiuni descrescătoare.

Observație: În mod similar se pot obține gelurile perlate de agaroză 2%, reducând proporțional cantitățile de materii prime folosite.

1.2.Reticularea suporturilor polihidroxilice (agaroză, amidon, alcool polivinilic etc.)

Reticularea macromoleculilor lineare de suport are ca scop transformarea lor într-o specie moleculară cu structură tridimensională, insolubilă în apă chiar la cald și cu o rezistență mecanică mărită.

Agenții de reticulare sunt în general compuși di- sau polifuncționali, capabili să lege încrucișat două sau mai multe lanțuri macromoleculare lineare.

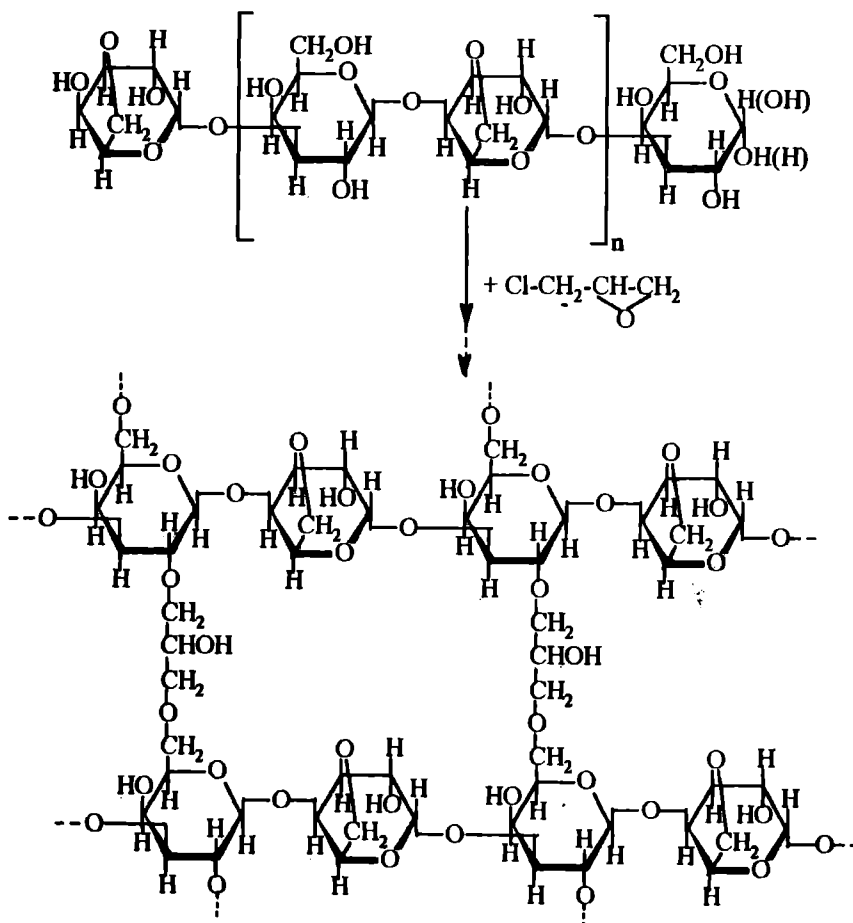
Un agent bifuncțional foarte reactiv și accesibil din punct de vedere economic este epichelorhidrina $\text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2\text{Cl}$, care reacționează simultan (la pH slab alcalin) cu

grupele $-\text{OH}$ aflate pe două molecule paralele de agaroză (figura nr.1).

După cum se observă din figura nr.1, agaroză, alcătuită din resturi de 3, 6 – anhidro – L – galactoză și D – galactoză, reacționează cu epichelorhidrina prin intermediul grupelor $-\text{OH}$ primare din moleculă, conducând la un reticulat insolubil în apă la fierbere și cu bune proprietăți reologice.

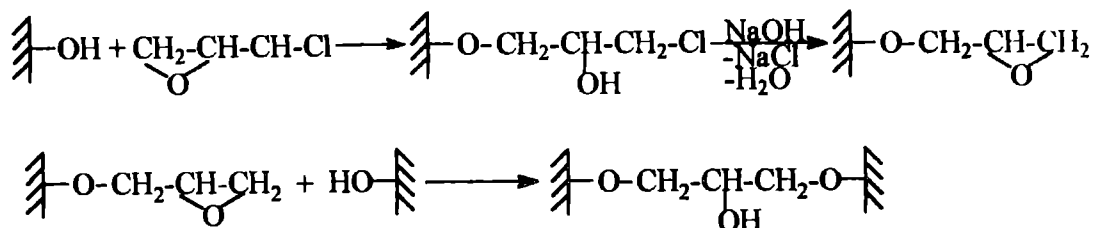
Figura nr.1

Reticularea agarozei cu epichelorhidrină



Mecanismul schițat în figura nr.2 este valabil pentru reticularea tuturor suporturilor polihidroxicile.

Figura nr.2

Mecanismul reticulării suporturilor polihidroxilice cu epichelorhidrină**Materiale necesare:**

| | |
|------------------------------|--------------------------|
| -gel perlat depus de agaroză | 100ml; |
| -NaOH 5N | 40ml; |
| -epichelorhidrină | 3ml (0,38 moli) – 3,54g; |

Mod de lucru:**Varianta A**

Într-un pahar Berzelius plasat pe o baie de gheață, se introduc 100ml gel perlat, depus, de agaroză (cu dimensiunea medie a particulelor de 35-50 mesh), tras la trompă în prealabil, pentru îndepărtarea apei.

Peste gel, se adaugă treptat, prin omogenizare cu o baghetă, 40ml NaOH 5N, astfel ca temperatura amestecului de reacție să nu depășească 2-3°C.

După o omogenizare de ≈ 30 min. se adaugă treptat, în picături și sub agitare, 3ml epichelorhidrină.

După terminarea adăugării, se lasă amestecul pe baia de gheață timp de 30 minute, sub agitare ocazională. Apoi, paharul acoperit cu o sticlă de ceas se plasează pe o baie de apă și se încălzește la 45-50°C, sub agitare, timp de 60 minute. Pentru definitivarea reacției, se continuă încălzirea încă 120 minute la 80-85°C.

După trecerea acestui timp, amestecul de reacție se suspendă în 800-1000ml apă distilată și se lasă în repaus 24 de ore.

În mod similar se reticulează și amidonul granulat.

A doua zi, se decantează supernatantul și se spală particulele de gel cu apă distilată, la trompă, pe o pânză cu masă filtrantă, până la reacția neutră a apei de spălare.

Varianta B

Pentru a evidenția influența cantității de agent de reticulare asupra gradului de agregare a gelului-suport, cantitatea inițială de gel perlat depus și tratat cu NaOH 5N la rece timp de 30 min. (ca în varianta A), se împarte în trei părți egale, folosind trei eprubete gradate.

Se continuă apoi modul de lucru ca la varianta A, adăugând în cele trei eprubete cantități crescătoare de epichlorhidrină (1, 2, 3 ml). După prelucrarea reticulatelor în modul descris la varianta A, acestea se lasă în repaus timp de câteva zile, pentru a se observa modul diferit de gonflare a gelului, prin citirea volumului ocupat de acesta în fiecare dintre eprubete.

Reticularea gelurilor-suport nu trebuie să fie prea avansată, gradul înalt de agregare conducând la rețele tridimensionale foarte strânse, în interstițiile cărora accesul biocatalizatorilor și al substratelor voluminoase fiind redus drastic.

I.3.Determinarea unor parametri caracteristici ai gelurilor-suporturi

Atât pentru utilizarea lor în laborator cât și în bioreactoare, gelurile perlate trebuie să îndeplinească o serie de condiții specifice, legate de: capacitatea de a reține apa, posibilitatea de gonflare, de compactare etc.

I.3.1.Determinarea umidității suportului

Supporturile macromoleculare modificate sau nu, care conțin grupe nucleofile ca $-NH_2$ sau $-COOH$, capabile să rețină apa prin intermediul legăturilor de hidrogen sunt în general polizaharide modificate, cu caracter de schimbători de ioni. Cunoașterea conținutului în umiditate al acestor suporturi este importantă pentru operarea corecțiilor necesare în cazul dozării grupelor $-COOH$ și $-NH_2$ libere, capabile să lege moleculele de proteine.

Mod de lucru:

Se cântărește aprox. 1g suport care se usucă pe o sticlă de ceas în etuvă, 10 ore, la $60^\circ C$. Conținutul în umiditate este dat de relația:

$$\%umiditate = \frac{b}{a} \cdot 100, \text{ în care:}$$

a = cantitatea de suport luată pentru detereminare (în g),

b = cantitatea de suport după uscare (în g).

I.3.2.Determinarea capacității de îmbibare

Supporturile insolubile pot reține apa prin legături de hidrogen, capacitatea lor de îmbibare fiind legată de tipul și numărul de grupe hidrofile ($-OH$, $-COOH$, $-NH_2$ etc.) de pe suprafață.

Cum majoritatea reacțiilor enzimatică au loc în mediu apos, capacitatea de îmbibare a suportului este un parametru important pentru proiectarea instalațiilor în care se lucrează cu asemenea suporturi.

Practic, capacitatea de îmbibare reprezintă cantitatea de apă reținută de 1g suport uscat.

Mod de lucru:

Într-un pahar Berzelius de 100ml se introduc: 1g suport uscat peste noapte (vezi determinarea de la paragraful I.3.1.) și 50ml apă distilată.

După o ședere de 24 de ore la temperatura camerei, produsul se trece cantitativ într-un cartuș filtrant tarat și se centrifughează 30 min. la o turație mică, după care se cântărește cartușul cu gelul centrifugat.

Într-o altă variantă, gelul se filtrează la trompă pe o pâlnie cu masă filtrantă tarată.

Diferența de greutate dintre cartușul filtrant cu gel (sau pâlnie filtrantă cu gel) și cartușul sau pâlnia goale reprezintă masa (*b*) a suportului îmbibat cu apă.

Capacitatea de îmbibare ("Water regain") se determină prin relația:

Water regain (g) = $b-a$, în care:

a = 1g suport luat în lucru,

b = masa suportului îmbibat (în g).

I.3.3. Volumul de umflare (gonflare)

Mod de lucru:

Într-un pahar Berzelius se introduce 1g suport uscat în prealabil (ca la paragraful I.3.1.) peste care se toarnă 50ml apă distilată. După un repaus de 24 ore la temperatura camerei, se transferă gelul gonflat într-un cilindru gradat. Se lasă să se sedimenteze timp de o oră, după care se citește volumul ocupat de suportul îmbibat.

I.3.4. Viteza de curgere prin coloană

Viteza de curgere liniară a unui volum dat de apă printr-un pat de gel-suport este un parametru deosebit de important la proiectarea bioreactorilor cu pat compact, de tip coloană, la care se cere o alimentare continuă cu soluție de substrat, astfel încât reacția enzimatică să decurgă cu o viteză satisfăcătoare.

O traversare prea rapidă a patului de biocatalizator imobilizat de către soluția substratului face ca reacția enzimatică să decurgă incomplet, parte din substrat rămânând nereacționat. Pe de altă parte, factorii difuzionali legați de forma, mărimea și porozitatea imobilizatului pot determina o compactare a gelului, ceea ce duce la încetinirea și chiar stoparea scurgerii soluției de substrat prin coloana-reactor, producându-se întreruperea reacției.

Mod de lucru:

Într-o coloană de sticlă cu diametrul de 1cm și lungimea de aprox. 75cm, închisă la partea inferioară cu o frită de sticlă sau cu un dop din vată minerală, se introduce o cantitate de suport gonflat (ca la paragraful I.3.3.), corespunzătoare formării unui pat de gel de 10cm înălțime.

Se aplică la partea superioară a coloanei un strat de apă distilată de 50cm înălțime, măsurându-se debitul de scurgere (volumul apei scurse) la intervale egale de timp (1,5 sau 10 min.), în funcție de viteza cu care apa traversează patul de gel. Rezultatele se vor trece într-un tabel cu următoarele coloane: tipul de suport; timpul de scurgere; volumul de scurgere la intervale de timp; volumul total de apă distilată scurs.

Un gel-suport cu proprietăți satisfăcătoare trebuie să prezinte o viteză de scurgere de cel puțin 0,3-1ml/min.

Observații:

1) Pentru a se face o comparație între proprietățile aceluiași gel perlat sau granulat, se pot face determinări în paralel, cu două coloane. Comparația va fi întotdeauna în favoarea gelului perlat, la care posibilitatea tasării (compactării) este mult mai mică.

2) Gelurile pentru care viteza de scurgere este nesatisfăcătoare (mult mai mică sau mult mai mare decât 0,3-1ml/min.) pot fi reticulate cu epichlorhidrină (vezi paragraful I.2.). Suporturile reticulate și gonflante vor fi apoi din nou supuse determinării după modul de lucru descris.

Rezultatele pot arăta, în unele cazuri (agaroză, DEAE-Sephadex etc.) o îmbunătățire substanțială a vitezei de scurgere care devine satisfăcătoare. În alte cazuri (chitină), reticularea nu conduce la o modificare semnificativă a acestui parametru.

În fine, alte suporturi reticulate (CMC, alcool polivinilic etc.) nu se mai tasează în coloană, dar vitezele de scurgere rămân în afara limitelor admise.

I.4. Activarea suporturilor polihidroxicice

Pentru imobilizarea biocatalizatorilor prin legare covalentă de suport este necesară o preactivare a suporturilor polihidroxicice (polizaharide, alcool polivinilic, sticlă poroasă etc.), în care grupele – OH nu sunt suficient de reactive pentru a reacționa direct cu grupele funcționale libere din moleculele proteinelor.

Etapă de preactivare se bazează pe posibilitatea grupelor – OH de a se transforma, în urma unor reacții chimice, în grupe cu reactivitate crescută (imidocarbonat, duble legături activate, halogen reactiv etc.) capabile de a reacționa cu proteinele fie direct, fie prin intermediul unui braț lateral ("spacer").

Spacerul are rolul de a reduce împiedicările sterice care pot apărea în imediata vecinătate a suportului (mai ales în cazul substratelor și produșilor macromoleculari) ca și de a evita efectele unor interacții electrostatice nedorite ale unor grupe polare din microvecinătatea enzimei fixată direct pe suport.

Astfel, în lipsa unui "spacer" care să îndepărteze enzima de suprafața suportului pot apare interacții nedorite, mai ales la enzimele active față de substrat macromoleculare (proteaze, amilaze, nucleaze etc.).

De asemenea, dacă imobilizatul urmează să fie utilizat în cromatografia afină, este de preferat ca biocatalizatorul să fie legat la o oarecare distanță de suprafața suportului, mai ales când tehnica cromatografică urmărește izolarea unor parteneri afini cu masă moleculară mare (acizi nucleici, inhibitori naturali ai enzimelor etc.), în aceste cazuri factorul steric fiind esențial.

Rezumând, etapele principale ale imobilizării biocatalizatorilor pe un suport polihidroxilic vor fi:

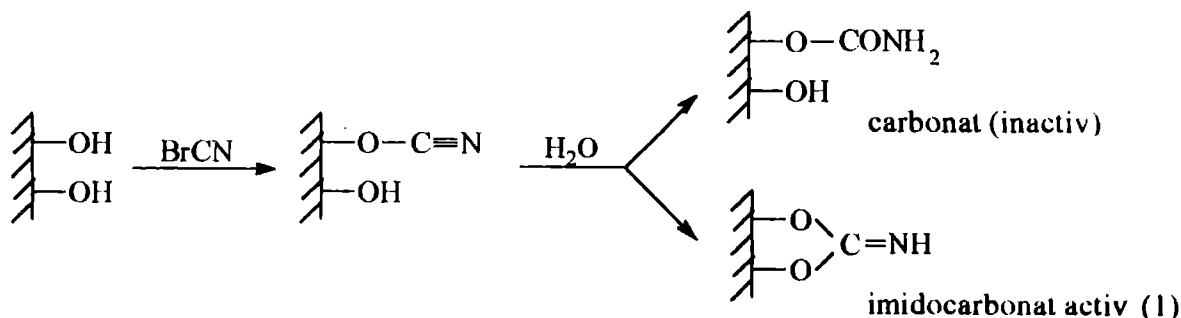
- a) perlarea suportului;
- b) reticularea suportului;
- c) activarea grupelor – OH;
- d) introducerea unui “spacer” cu o grupă reactivă liberă (etapă nu întotdeauna obligatorie);

e) imobilizarea covalentă a enzimei în urma reacției dintre grupele reactive ale suportului activat și grupele libere din moleculele biocatalizatorului (- NH₂, - OH alcool sau fenolic, - COOH, - SH, nuclee aromatice sau heterociclice).

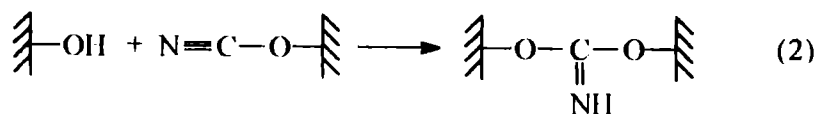
În unele cazuri este necesară și o preactivare a biocatalizatorului, care precede etapa e).

I.4.1. Activarea agarozei cu bromcian

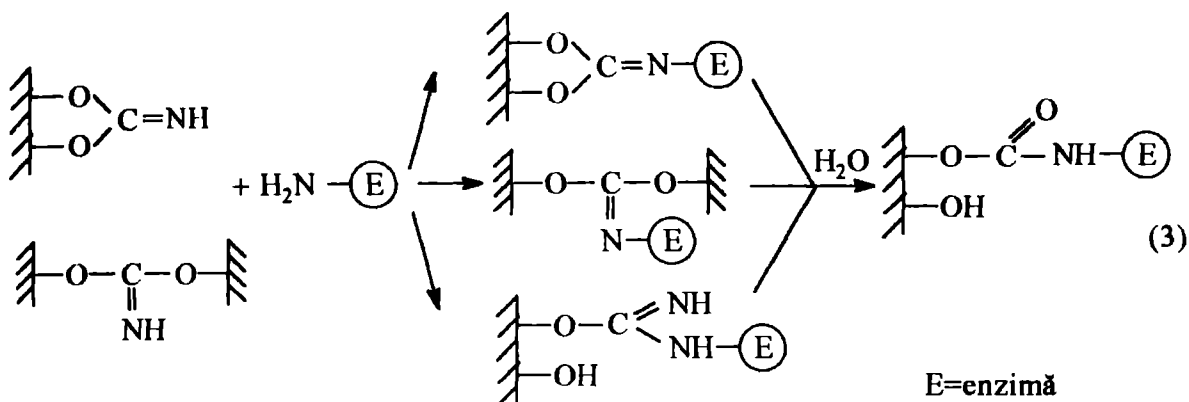
Suporturile polihidroxilice reacționează cu bromcianul cu formarea grupei imidocarbonat (1) care poate lega cu ușurință biocatalizatorii cu un conținut ridicat de grupe – NH₂ (enzime, membrane celulare etc.).



O parte din suport suferă o reticulare:



Atât imidocarbonatul (1) cât și reticulatul (2) reacționează cu grupele -- NH₂ libere ale biocatalizatorului, conducând la același imobilizat (3):



Proprietățile aductului (3) depind atât de condițiile reacției de cuplare cu enzima, cât și de rearanjările moleculare care pot surveni în cazul stocării îndelungate a imobilizatului.

Un grad mai avansat de legare (prin mai multe puncte) între enzimă și suport conduce la creșterea stabilității operaționale a aductului în comparație cu cel cu un singur punct de legătură. De aceea, un gel de imidocarbonat înalt substituit va putea fi folosit la imobilizarea enzimelor cu activitate scăzută.

A. Activarea agarozei (gel 6%)

Materiale și aparatură necesare:

- gel depus de agaroză perlată și reticulată (6%) cu dimensiuni ale particulelor de 35-50 mesh 30ml;
- BrCN 0,5g;
- NaOH 2N;
- NaHCO₃ 0,1N;
- pH-metru cu electrod mixt standardizat.

Mod de lucru:

30ml gel depus de agaroză perlată (6%) și reticulată, se suspendă în 25ml apă distilată, sub agitare magnetică, într-un pahar Berzelius de 100ml.

Separat se pregătește o soluție formată din 0,5g BrCN în 20ml apă distilată (Atenție! Se va lucra într-o nișă cu tiraj bun, BrCN fiind foarte toxic).

Soluția de BrCN se adaugă, sub agitare, la suspensia de agaroză. Agitarea se continuă 8-10min., ajustând pH-ul mediului de reacție cu NaOH 2N, la 10-11, prin titrare potențiometrică. Gelul format se filtrează la trompă și se spală pe pâlnie cu 500ml apă răcită cu gheață.

Produsul obținut se folosește imediat la imobilizarea enzimelor sau pentru introducerea de brațe laterale ("spacer").

Observație: În locul agarozei perlate și reticulate se poate folosi alcoolul polivinilic perlat și reticulat cu epichelohidrină, modul de lucru fiind același.

B.Activarea Sepharozei 4B cu BrCN

În funcție de scopurile în care urmează a fi folosit imobilizatul, se alege una dintre următoarele variante.

Varianta 1°

Materiale și aparatură necesare:

- Sepharoză 4B perlată (gel depus);
- NaOH 2M;
- BrCN;
- NaHCO₃ 0,1M;
- pH-metru cu electrod mixt standardizat.

Mod de lucru:

O cantitate de Sepharoză 4B perlată (gel depus) se suspendă în apă distilată (astfel ca gelul format să corespundă unei concentrații de 20mg Sepharoză/ml apă) și se lasă în repaus 25h. După scurgerea acestui timp, se transferă gelul umectat într-un vas de reacție (pahar Berzelius), prevăzut cu agitator magnetic, un electrod mixt de pH cufundat în masa gelului și conectat la un pH-metru și o biuretă de titrare umplută cu soluție de NaOH 2M.

Se începe agitarea și se adugă treptat, prin picurare, o soluție formată dintr-o cantitate de BrCN egală (în greutate) cu cea de gel inițial luat în lucru (Sepharoza 4B perlată) dizolvat în apă distilată, astfel ca soluția să aibă o concentrație de 25mg BrCN/ml apă.

Se ajustează pH-ul la 11 prin titrare cu NaOH 2M, timp de 10 min. Gelul activat se filtrează la presiune redusă și se spală pe pâlnie, în ordine, cu: 200ml apă distilată rece și cu 100ml soluție NaHCO₃ 0,1M răcită.

Gelul astfel activat se utilizează pentru imobilizarea inhibitorului de tripsină din fasole soia, sau pentru co-imobilizarea enzimelor: malat-dehidrogenază, citrat-sintetază și lactat-dehidrogenază.

Varianta 2°

Se utilizează pentru obținerea unui gel activat, cu grad înalt de substituție.

Materiale necesare:

- Sepharoză 4B perlată (gel depus);
- tampon fosfat de potasiu 2M (pH=12,1) și 5M (pH=12,1);
- BrCN;
- acetonitril.

Mod de lucru:

Sepharoza 4B este spălată cu un tampon fosfat de potasiu 2M (pH=12,1) și filtrată la trompă, pe o pâlnie cu masă filtrantă.

Apoi, la fiecare 10g gel se adaugă câte 10ml tampon-fosfat de potasiu 5M (pH=12,1) și câte 20ml apă distilată. Se agită într-un pahar Berzelius prevăzut cu agitare magnetică.

La suspensia astfel formată se adaugă în picături, sub agitare moderată, o soluție apoasă de BrCN (100mg/ml apă distilată). Cantitatea de BrCN este egală cu cea de gel inițial luat în lucru (Sephază 4B perlată).

În cazul în care BrCN comercial este greu solubil în apă, se poate dizolva în acetonitril (2g BrCN/ml acetonitril). Adăugarea soluției de BrCN durează 2 min., timp în care temperatura amestecului de reacție se menține la 5-10°C prin răcire exterioară, într-o baie de apă cu gheață.

După terminarea adăugării, se continuă agitarea la rece încă 10 min., pentru definitivarea reacției.

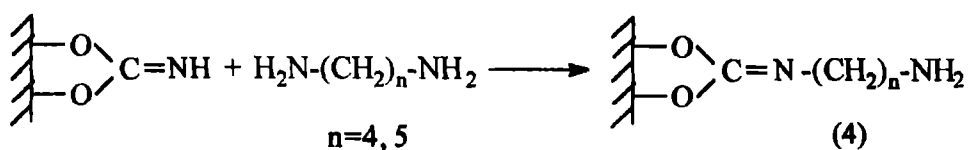
Gelul activat se filtrează la presiune redusă pe o pâlnie cu masă filtrantă și se spală pe pâlnie cu apă distilată rece. Se folosește imediat pentru imobilizare; se poate păstra la frigider câteva zile, dar este de preferat să fie utilizat imediat.

Pentru obținerea unui gel cu grad mare de activare se lucrează în același fel, utilizând cantități mai mari de BrCN (20mg BrCN/ml apă).

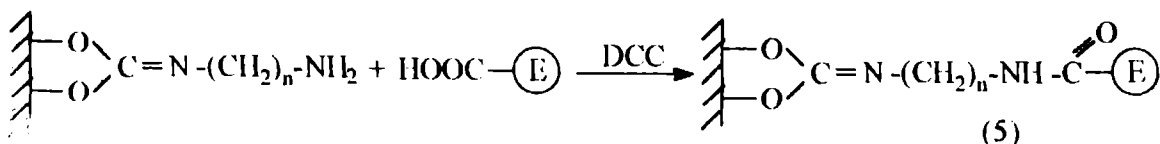
Preparatele comerciale se agaroză activată pot fi păstrate la rece (în frigider) în stare uscată, fiind stabile perioade mai mari de timp.

1.4.1.1. Introducere de brațe amino-terminale pe suporturile hidroxicile activate cu BrCN

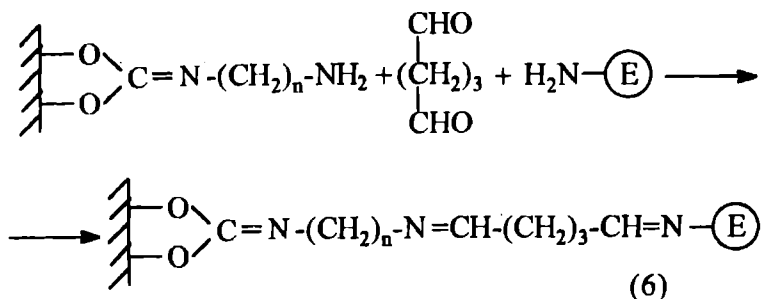
În scopul fixării pe macromoleculele de suport polihidroxic activat cu BrCN a unui "spacer" cu grupe NH₂ terminale, reactive, se folosesc diaminele alifatiche ca: 1,4-tetrametilen-diamină (putresceina) și 1,5-pentametilen-diamina (cadaverina):



Derivatul (4) astfel obținut va putea fi folosit la imobilizarea enzimelor fie direct, prin intermediul grupelor -COOH libere ale biocatalizatorului (5), fie prin co-reticularea mixtă cu gluturaldehidă între suportul activat cu grupe -NH₂ terminale și enzimele cu grupe -NH₂ libere (6):



DCC = diciohexilcarbodiimidă (C₆H₁₁-N=C=N-C₆H₁₁)



Reticulare cu formare de grupe azometin (baze Schiff).

a) Reacția cu putresceină

Materiale necesare:

- gel depus de agaroză (sau alcool polivinilic) reticulat cu epichelorhidrină și activat cu BrCN 25ml;
- putresceină 1g (1,14ml);
- HCl 6N;
- NaCl 0,5M;
- glutaraldehydă (Atenție! toxică).

Mod de lucru:

Într-o capsulă tarată și plasată într-o nișă cu tiraj bun, se introduc 25ml gel depus de agaroză sau de alcool polivinilic reticulat cu epichelorhidrină și activat cu BrCN și se tratează cu o soluție formată prin dizolvarea a 1g putresceină în 15ml apă distilată. Se ajustează pH-ul soluției cu HCl 6N la 9,5-10,5 și se agită amestecul, pentru omogenizare, cu o baghetă de sticlă. Se acoperă capsula și se lasă în repaus 12 ore la temperatura camerei; după care produsul format se filtrează la presiune redusă pe o pâlnie Buchner și se spală pe pâlnie, alternativ, cu apă distilată și cu o soluție de NaCl 0,5M, până la îndepărtarea completă a putresceinei nereacționate (reacție negativă cu câteva picături de glutaraldehydă a apei de spălare. Lipsa aminei se depistează prin dispariția culorii galbene a bazei Schiff formată cu glutaraldehyda).

În gelul astfel obținut se determină cantitatea de grupe $-\text{NH}_2$ introduse (vezi pag.16).

b) Condensarea cu cadaverină

Materiale necesare:

- gel depus de Sepharoză 4B perlată și activată cu BrCN 1g;
- cadaverină 1,5g (1,63ml);
- HCl 6N;
- NaCl 0,5N;
- glutaraldehydă;
- tampon-fosfat de potasiu 0,1M (pH=6,9);
- reactiv Schiff.

Mod de lucru:

Într-o capsulă plasată într-o nișă cu tiraj bun se introduce 1g gel depus de Sepharoză 4B perlată și activată cu BrCN, care se tratează, prin amestecare cu o baghetă, cu 1,5g cadaverină dizolvată într-o cantitate minimă de apă distilată.

Se ajustează pH-ul mediului la 8,5 cu o soluție de HCl 6N, sub agitare cu bagheta. Se acoperă capsula și se lasă în repaus 12 ore la temperatura camerei. Produsul reacției se filtrează la presiune redusă și se spală pe pâlnie, alternativ, cu apă distilată și cu o soluție apoasă de NaCl 0,5N, până la reacția negativă a apei de spălare cu reactiv Schiff.

Gelul se transferă apoi într-un pahar în care se adaugă 20ml soluție tampon-fosfat de potasiu 0,1 M (pH=6,9), care conține 4% (în volume) glutaraldehidă. Se agită amestecul de reacție timp de 4 ore la temperatura camerei (aprox. 25°C). Gelul condensat se filtrează la presiune redusă și se spală bine cu apă distilată pentru îndepărtarea glutaraldehidei nereacționate (reacție negativă cu reactiv Schiff a apei de spălare sau reacție Fehling negativă).

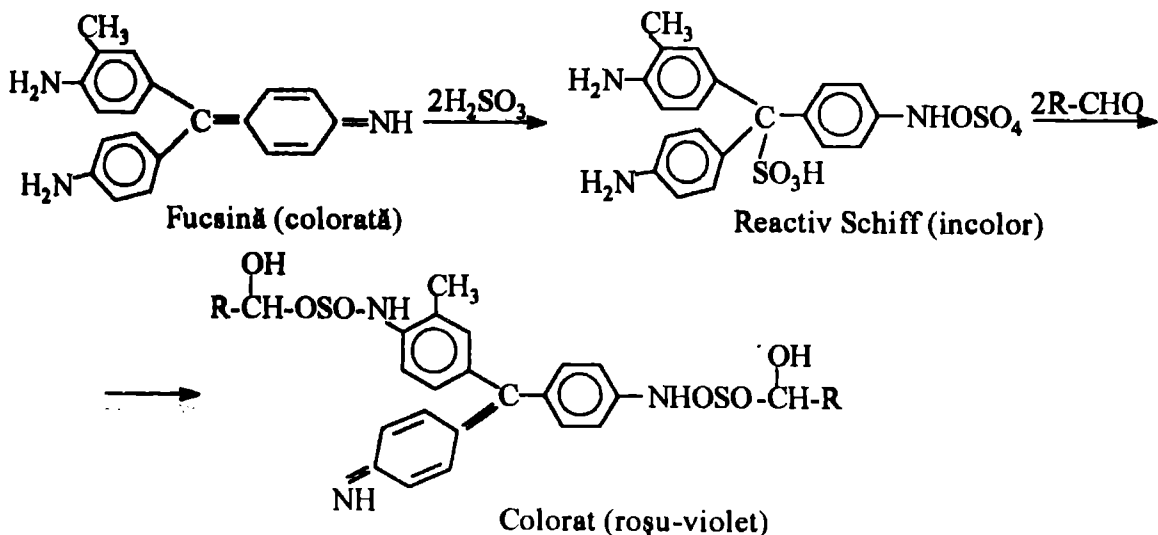
În urma acestei condensări, una dintre cele două grupe CHO ale glutaraldehidei a reacționat cu grupa -NH₂ de pe suportul activat (formând o azometină sau bază Schiff), cea de a doua grupă CHO rămânând liberă pentru fixarea enzimelor (pag.14).

Gelul activat astfel obținut se folosește la co-immobilizarea unor enzime multisecvențiale (malat dehidrogenaza- citrat sintetaza-lactat dehidrogenaza).

Observatii:

1)Reacția Schiff este caracteristică alchidelor și constă în recolorarea reactivului Schiff (soluție de fucsină decolorată cu SO₂) la contactul cu grupa - CHO.

Se reface structura chinoidică a fucsinei, proba colorându-se în roșu-violet:



În funcție de reacționabilitatea alchidelor testate, colorația apare la temperatura camerei imediat sau după un repaus de 5-15 min.

Reactivul Schiff se prepară astfel: se dizolvă 0,2g fucsină în 200ml apă distilată și se adaugă 2g bisulfid de sodiu în 2ml HCl concentrat. Decolorarea soluției de fucsină se poate face și prin barbotarea SO₂ (se evită excesul de SO₂ care micșorează sensibilitatea reactivului).

Reactivul se prepară cu câteva zile înainte de întrebuințare; se păstrează la întuneric, într-o sticlă brună bine închisă.

Identificarea alchidelor

Într-o eprubetă se toarnă 1ml reactiv Schiff, peste care se adaugă 1-2ml soluție de aldehydă în etanol sau apă. La început amestecul se colorează în roșu-albăstrui; prin adăugarea a 0,5ml HCl conc. culoarea virează la albastru-violet.

2) Modul de prepararea a reactivului Fehling și reacția Fehling sunt descrise la pag.37.

c) Determinarea conținutului în grupe -NH₂ dintr-un suport

Dozarea grupelor -NH₂ din suporturile activate sau nu (chitosan, DEAE-celuloză, DEAE-Sephadex, suporturi polihidroxicile activate cu diamine alifatiche etc.) este foarte importantă, de numărul acestora depinzând atât natura cât și cantitatea de enzimă utilizată în etapa imobilizării.

Se folosesc în general două metode:

-titrarea cu HCl (aplicabilă în toate cazurile);

-determinarea conținutului în azot al suportului (dacă suportul nu a fost activat în prealabil cu BrCN).

Titrare potențiomtrică

Materiale și aparatură necesare:

-gel depus de suport cu grupe NH₂ 10ml;

-NaOH 0,5N 50ml;

-NaCl 1M;

-HCl 0,1N;

-pH-metru cu electrod mixt standardizat.

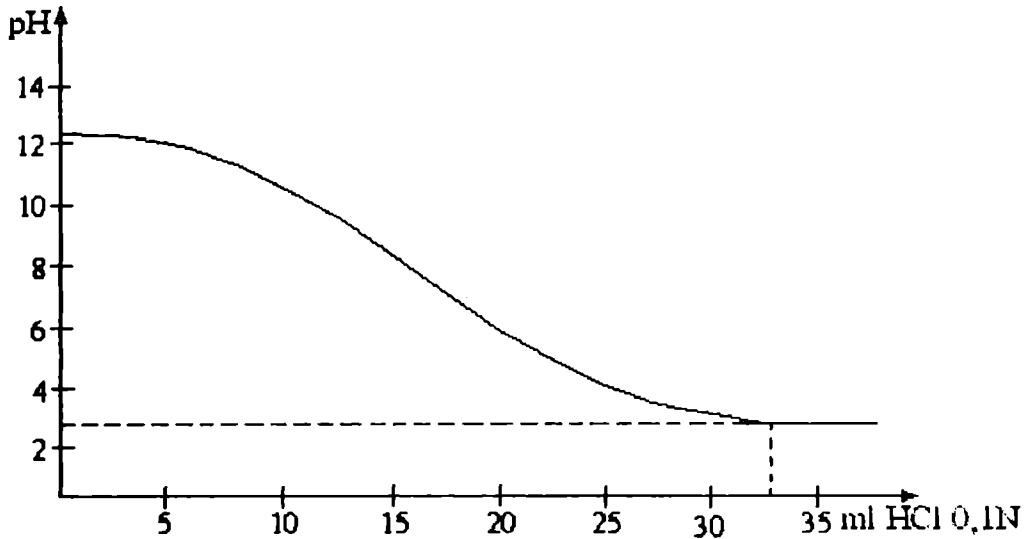
Mod de lucru:

Într-un pahar Berzelius de 150-200ml se introduce 10ml gel depus de agaroză sau alcool polivinilic activat, cu brațe -NH₂ terminale, sau alte suporturi cu grupe NH₂ libere, ca: chitosan sau schimbători de ioni cationici (AE-celuloză, DEAE-celuloză, DEAE-Sephadex, DEAE-Sepharoză etc.) și 50ml soluție NaOH 0,5N. Se amestecă bine cu o baghetă, după care se filtrează gelul la presiune redusă și se spală pe pânză cu apă distilată până la pH neutru. Gelul astfel neutralizat se trece cantitativ într-un vas de titrare prevăzut cu agitator magnetic, în care se introduce și 25ml soluție NaCl 1M. Se titrează cu HCl 0,1N până la pH=3,0 (se utilizează un pH-metru cu electrod mixt).

Se trasează o curbă de titrare potențiometrică asemănătoare cu cea din figura nr.3:

Figura nr.3

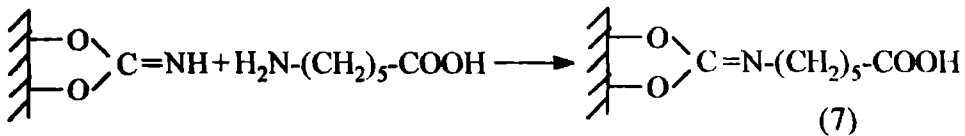
Curba titrării potențiometrice a unui gel de DEAE-Sephadex



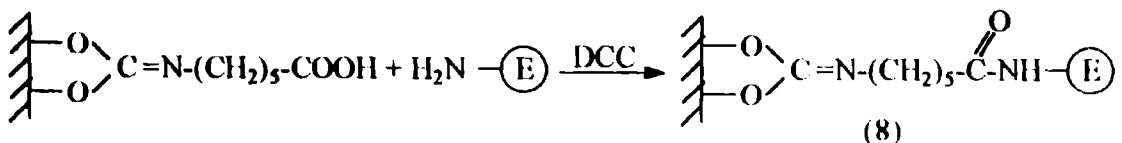
Conținutul în grupe NH_2 se exprimă în $\mu\text{moli/ml}$ gel. În cazul exemplificat în figura nr.3, acesta este de $280 \mu\text{moli/ml}$ gel.

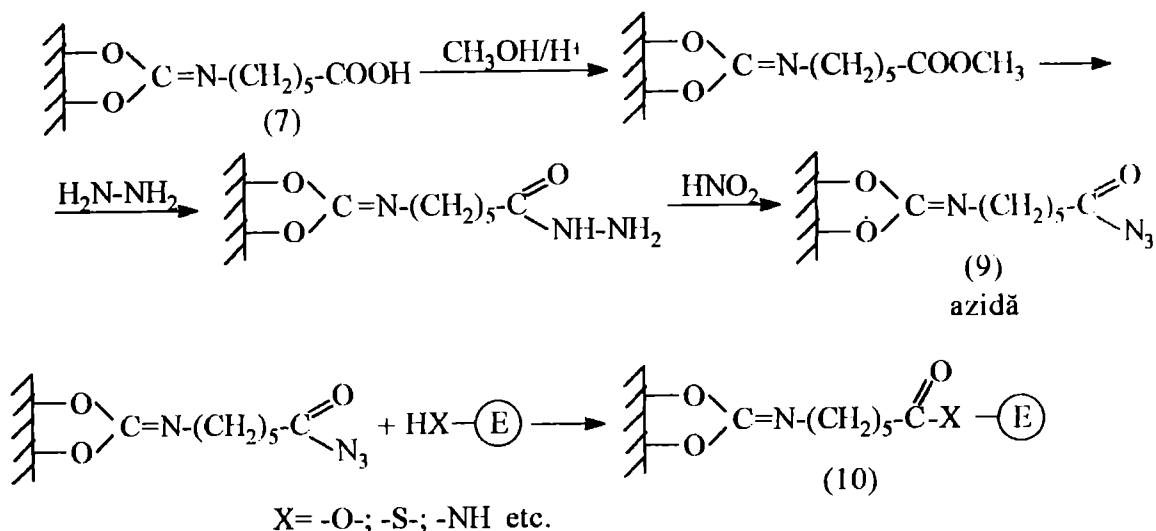
I.4.1.2. Introducerea de brațe carboxi-terminale pe suporturile polihidroxilice activate

Reactivul uzual pentru introducerea unui "spacer" cu grupa $-\text{COOH}$ terminală este acidul ϵ -aminocaproic:



Suportul activat astfel (7) poate fixa enzimele, fie prin condensare directă în prezența unei carbodiimide (8), fie prin activare intermediară la azidă (9), urmată de cuplarea cu enzimă (10):





a) Introducerea "spacer"-ului -COOH

Materiale necesare:

- gel depus de agaroză perlată sau alcool polivinilic perlat, reticulat și activat cu BrCN 25ml;
- acid ϵ -aminocaproic 2g;
- NaHCO₃ 0,1N;
- NaCl 0,5M.

Mod de lucru:

Într-o capsulă tarată se introduc 25ml gel depus de agaroză sau PVA (alcool polivinilic) perlat, reticulat cu epiclohidrină și activat cu BrCN, peste care se adaugă o soluție formată din 2g acid ϵ -aminocaproic în 15-20ml NaHCO₃ 0,1N. Se omogenizează bine amestecul cu o baghetă, se acoperă capsula și se lasă în repaus peste noapte, la temperatura camerei, pentru definitivarea reacției (la nișă).

După aprox. 12 ore de repaus, produsul de reacție se filtrează pe o pâlnie Büchner și se spală alternativ, pe pâlnie, cu apă distilată și NaCl 0,5M, până la îndepărtarea totală a acidului nereacționat (pH neutru în apa de spălare).

b) Determinarea conținutului în grupe -COOH prin titrare potențiometrică

Metoda este aplicată pentru dozarea grupelor -COOH nu numai din suporturile activate cu grupe carboxil terminale utilizate la fixarea enzimelor prin legături covalente, dar și la schimbătorii de ioni anionici pentru imobilizarea biocatalizatorilor prin legături ionice, dipolare (exemplu: CMC).

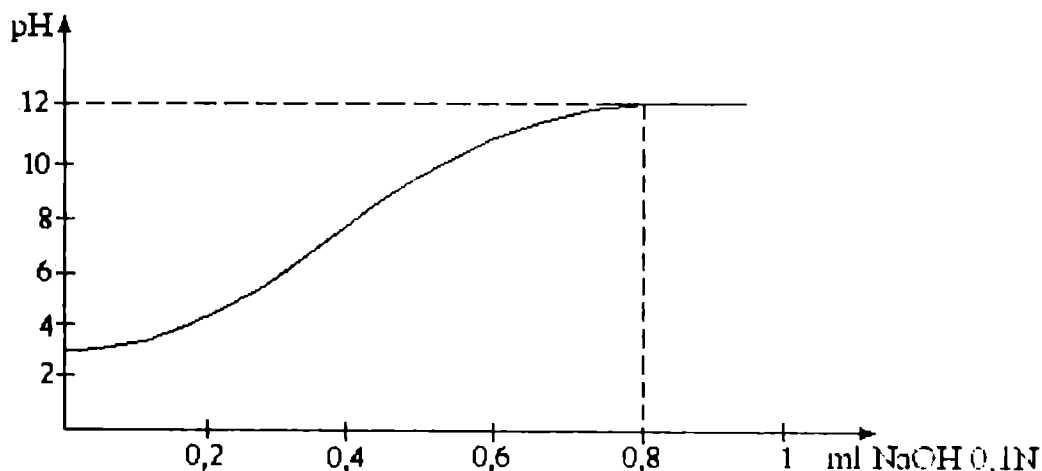
Materiale și aparatură necesare:

- gel depus de agaroză sau PVA activat cu brațe laterale prevăzute cu grupă COOH terminală (obținut după metoda descrisă anterior) sau CMC 10ml;
- HCl 0,1N 50ml;
- NaCl 1M;
- NaOH 0,1N;
- pH-metru cu electrod mixt standardizat.

Mod de lucru:

Într-un pahar Berzelius de 150ml se introduc 10ml gel de analizat și se amestecă cu 50ml HCl 0,1N, prin agitare cu o baghetă. Gelul neutralizat se filtrează la presiune redusă, pe o pâlnie cu masă filtrantă și se spală cu apă distilată până la pH neutru, după care se transferă cantitativ în vasul de titrare și se amestecă prin agitare magnetică cu 25ml soluție NaCl 1M. Se introduce electrodul mixt în masa de reacție și se titrează cu NaOH 0,1N sub agitare magnetică, până la pH=10,0. Citirile se trec într-un sistem de coordonate ca în figura nr.4.

Figura nr.4

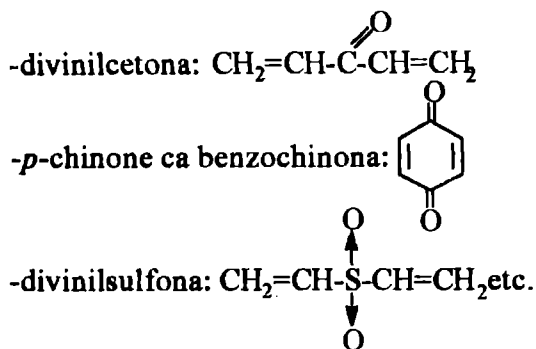
Curba titrării potențimetrice a unui gel de CMC

Din curba de titrare potențimetrică (fig.4) se observă că, în cazul dat, conținutul în grupe -COOH al unui gel de CMC este de 36μmoli/ml gel.

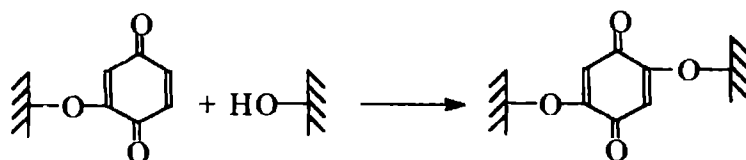
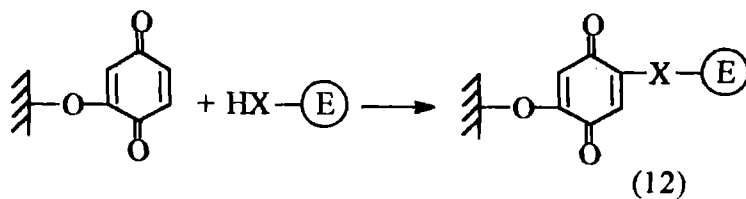
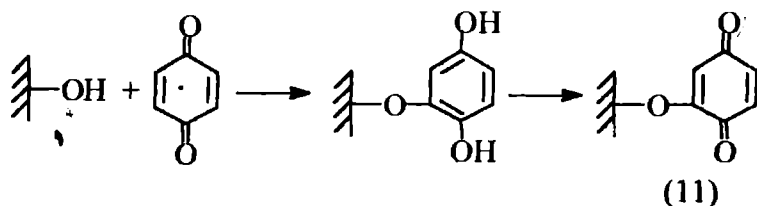
1.4.2.Activarea suporturilor polihidroxicice cu *p*-clnonă

Suporturile macromoleculare polihidroxicice se pot funcționaliza prin introducerea de grupe vinilice activate, datorită vecinătății unor substituenți cu efect -I (>C=O sau >SO_2).

Astfel de agenți de activare pot fi:



Benzochinona, un agent de activare foarte reactiv și relativ accesibil, reacționează cu suporturile având grupe OH pe suprafață, conducând la activarea acestora (11). Suportul astfel activat va putea fixa ulterior enzima prin intermediul celei de a doua grupe vinilice (ciclică), reactive (12).



X= -NH, -O-, -S-

I.4.2.1. Activarea Sepharozel 6B

Metoda poate fi aplicată unui gel de agaroză perlată 6%, reticulat sau nereticulat, deoarece benzochinona (agent bifuncțional) are și un efect de reticulare parțial a suportului.

Materiale necesare:

- gel de Sepharoză 6B, perlat, reticulat sau nereticulat 100ml;
- tampon fosfat de sodiu 0,1M (pH=8);
- benzochinonă 10,8g;
- etanol;
- NaCl 1M.

Mod de lucru:

Pe o pâlnie cu masă filtrantă, se spală la presiune redusă 100ml gel depus de Sepharoză 6B, cu un volum egal de tampon fosfat de sodiu pH=8, de concentrație 0,1M, conținând 20% etanol. Gelul astfel spălat se filtrează și se suspendă într-o soluție formată din 10,8g benzochinonă în 100ml tampon fosfat 0,1M (pH=8). Se agită cu o baghetă, timp de o oră, la temperatura camerei. Gelul activat se filtrează la presiune redusă și se spală pe pâlnie Büchner, în ordine, cu: etanol 20%; apă distilată; NaCl 1M; apă distilată și în final cu tamponul fosfat utilizat la cuplare. Sepharoza astfel activată se utilizează imediat pentru imobilizarea α -chimotripsinei (pag.5).

1.4.2.2. Activarea amidonului

Materiale necesare:

- amidon granulat și reticulat cu epichelorhidrină (pag.6) 5g;
- tampon fosfat de sodiu 0,1M, pH=8 (care conține 20% etanol);
- p*-benzochinonă 2,7g;
- etanol 20%;
- NaCl 1M;
- tampon fosfat de sodiu 0,1M, pH=8 (fără etanol).

Mod de lucru:

5g de amidon granulat și reticulat cu epichelorhidrină se acoperă (pentru gonflare) cu un strat de tampon fosfat de sodiu 0,1M, pH=8 (care conține 20% etanol).

După îmbibare, se filtrează suportul pe o pâlnie Büchner, se spală cu tamponul de gonflare și se reia cu un volum minim din același tampon (cât să se acopere stratul de suport).

Se adaugă 2,7g *p*-benzochinonă și se omogenizează cu o baghetă, timp de o oră, la temperatura camerei. Gelul astfel activat se filtrează pe o pâlnie Büchner și se spală, în ordine, cu:

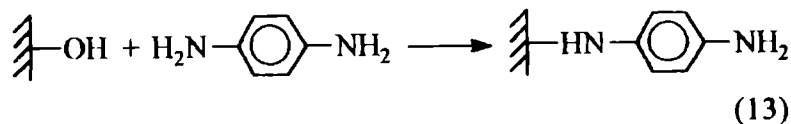
- etanol 20%;
- NaCl 1M;
- apă distilată;
- tampon fosfat 0,1M, pH=8 (fără etanol).

Se usucă la temperatura camerei și se utilizează imediat.

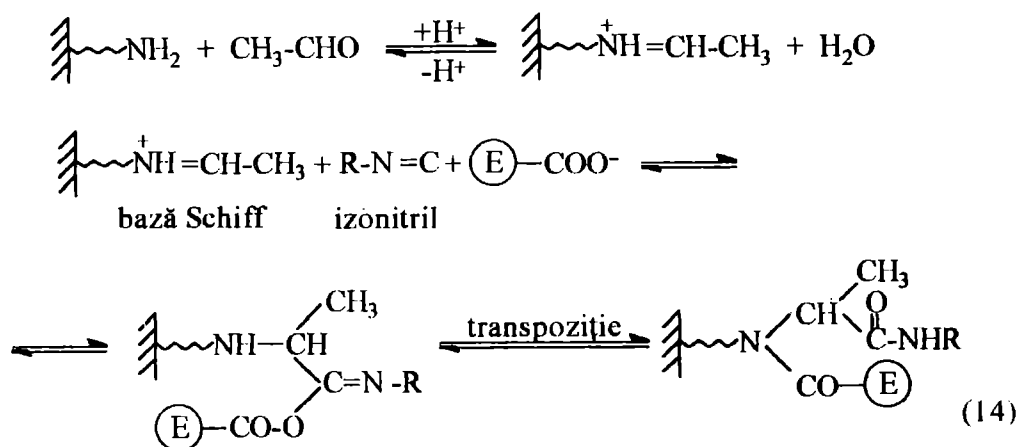
1.4.3. Activarea suporturilor polihidroxiice prin metoda izoclanajilor

Principiul general al acestei metode est bazat pe reacția Ugi (cu patru componente) și se folosește atât la imobilizarea unor proteine cu grupe libere $-COOH$ pe un suport polimer funcționalizat cu grupe $-NH_2$, cât și pentru fixarea proteinelor cu grupe NH_2 libere pe un suport funcționalizat cu grupe $-COOH$.

În cazul suporturilor macromoleculare polihidroxilice este necesară o preactivare a lor cu introducerea unei grupe NH_2 , de obicei prin intermediul *p*-fenilen-diaminei (13).



Urmează reacția Ugi, prin care se pot imobiliza enzime cu grupe $-\text{COOH}$ libere (14):



Obținerea *p*-fenilendiarnino-agarozei

Materialle necesare:

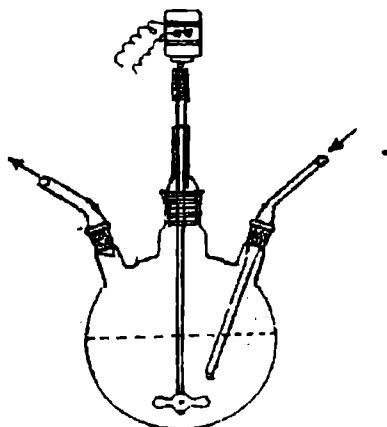
- gel perlat de agaroză 4%, reticulat cu epichlorhidrină și activat cu BrCN 25g;
- NaHCO_3 0,1M;
- p*-fenilendiamină 0,5g;
- tampon borat de sodiu 0,1M (în NaCl 1M), pH= 8,5;
- acetat de sodiu 0,1M (în NaCl 1M), pH= 4,5;
- tampon acetat de sodiu 0,1M, pH= 4,5;
- azidă de sodiu (NaN_3).

Mod de lucru:

Într-un balon cu trei găuri, prevăzut cu agitator mecanic și două tuburi de sticlă (pentru introducerea și evacuarea azotului), ca în figura nr.5, se introduc 25g gel perlat, reticulat și activat de agaroză 4% și o soluție de 0,5g *p*-fenilendiamină în 50ml NaHCO_3 0,1M.

Se pornește agitarea moderată. Prin amestecul format se barbotează timp de 15 min. un curent de azot, după care se lasă reacția să continue la întuneric, în vasul închis, timp de 16h, la temperatura camerei.

Figura nr.5
Instalația pentru obținerea *p*-fenilendiaminagarozei



Aminopolimerul obținut se filtrează la presiune redusă și se spală pe pânză în ordine cu:

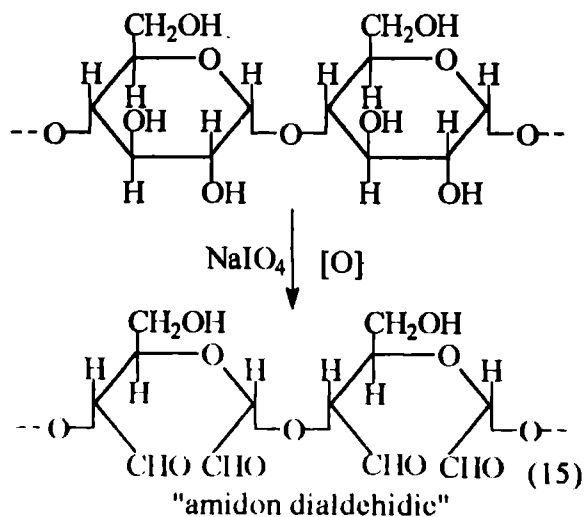
- tampon borat de sodiu 0,1M, pH= 8,5 (în NaCl 1M);
- acetat de sodiu 0,1M, pH= 4,5 (în NaCl 1M);
- tampon acetat de sodiu 0,1M, pH= 4,5.

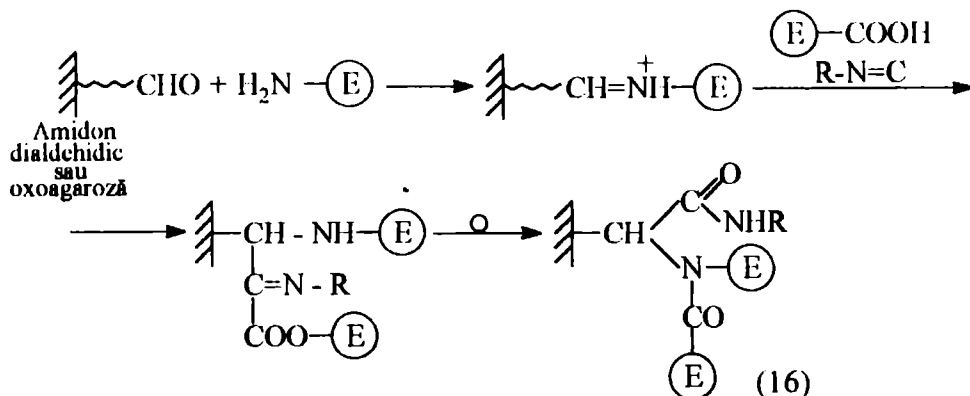
Produsul se păstrează la rece în ultimul tampon, adăugând pentru stabilizare 0,02% azidă de sodiu (raportat la greutatea aminopolimerului filtrat). Acest suport activat se utilizează pentru cuplarea pepsinei, în reacție lucrându-se cu acetaldehidă și ciclohexilizocianat (pag.56).

I.4.4. Activarea polizaharidelor prin oxidare cu NaIO_4

Amidonul și agaroză se pot activa prin oxidare parțială cu NaIO_4 . Se obțin "amidonul dialdehidic" (15) sau "oxi-agaroză", care conțin grupe $-\text{CHO}$ capabile de a imobiliza enzimele ce posedă atât grupe NH_2 cât și COOH , prin reacția Ugi (16).

Această metodă este utilizată pentru imobilizarea β -amilazei.





Obținerea oxoagarozei

Materiale necesare:

- gel de agaroză 2%, perlat și reticulat cu epichelorhidrină 100g;
- metaperiodat de sodiu 2g.

Mod de lucru:

Într-un pahar Berzelius de 400ml se introduc 100g gel agaroză 2% perlat și reticulat și 200ml apă în care s-au dizolvat 2g metaperiodat de sodiu. Suspensia formată se agită cu o baghetă și se plasează pe o baie de apă, aducându-se treptat temperatura amestecului de reacție la 45°C (în cca 20 min.). Se continuă agitarea blândă la această temperatură timp de 100 min.

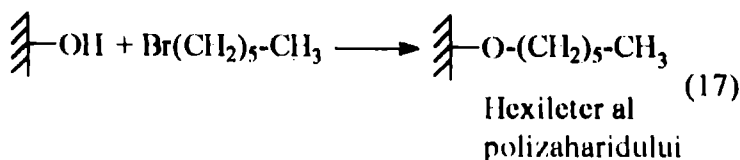
Oxoagaroza formată se filtrează la presiune redusă și se spală de câteva ori pe pânna Buchner cu apă distilată.

Se folosește imediat la imobilizarea β -amilazei (pag.57).

I.4.5. Activarea suporturilor polihidroxilice prin transformare în hexil-eteri

Metoda se bazează pe reacția dintre grupele OH ale suporturilor polihidroxilice și bromura de hexil (17).

Hexileterii rezultați sunt utilizați pentru imobilizarea fizică a proteinelor care conțin grupe funcționale capabile de a forma legături de hidrogen cu aceștia (-OH, -NH₂, -COOH).



Sinteza hexil-agarozei

Materiale necesare:

- gel depus de agaroză 6%, perlat și reticulat cu epichelorhidrină sau nereticulat 200ml;
- NaOH 5M;
- NaBH₄;
- bromură de *n*-hexil 50ml;
- HCl conc.;
- etanol.

Mod de lucru:

Într-un balon de 1l, prevăzut cu agitator mecanic și refrigerent ascendent, se introduc 200ml gel depus de agaroză 6%, perlat, reticulat sau nereticulat. Se adaugă 200ml soluție NaOH 5M, conținând 0,5% NaBH₄. Se începe agitarea și se introduc în balon 50ml bromură de *n*-hexil.

Se formează o suspensie, care se încălzește 35 ore la 100°C, prin agitare blândă.

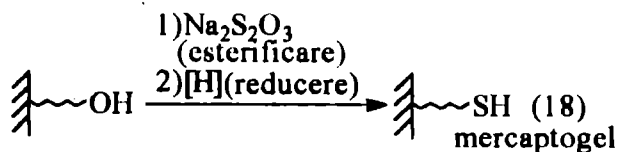
După terminarea reacției, se răcește conținutul balonului pe o baie de gheață și se neutralizează cu HCl conc.

Gelul format se filtrează la presiune redusă, pe o pâlnie cu masă filtrantă și se spală pe pâlnie, succesiv, cu: apă distilată, etanol, apă distilată și final cu soluția tampon din care urmează a se imobiliza enzima.

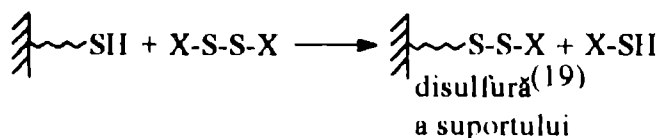
Pe acest suport se imobilizează fizic β -amilaza.

I.4.6. Activarea agarozel prin introducerea grupel disulfură

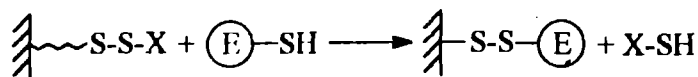
Supporturile polihidroxilice pot deveni mult mai reactive prin înlocuirea unor grupe –OH cu grupe –SH:




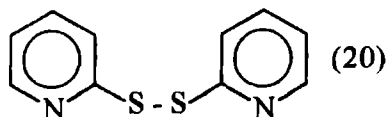
Mercaptogelul astfel obținut este activat printr-o reacție de dublu schimb cu o disulfură:



Aceeași reacție de dublu schimb este utilizată apoi în sens invers, pentru imobilizarea unor enzime bogate în resturi de cisteinil:



Metoda este atractivă, reacțiile decurgând cu ușurință la pH acid. Cea mai utilizată este α -piridinil-disulfura 20 (X=):



Prepararea disulfurii de α -piridil-agaroză

A.Reticularea agarozei 6%

Materiale necesare:

- gel perlat de agaroză 6% 30g;
- NaOH 5N;
- epiclorhidrină;
- tampon fosfat de sodiu 0,5M, pH=6,25.

Mod de lucru:

30g gel de agaroză 6%, spălat cu apă distilată și tras la trompă, se suspendă sub agitare moderată în 24ml soluție NaOH 5N, într-un pahar Berzelius. La această suspensie urmează a se adăuga în picături, sub agitare, o cantitate de epiclorhidrină, calculată în funcție de gradul de substituție cu grupe SH al mercaptogelului și anume:

-pentru obținerea unui mercaptogel cu aprox. 50 μ moli grupe SH/g produs uscat, se vor adăuga 0,75ml epiclorhidrină;

-pentru un mercaptogel cu grad de substituție de 700 μ moli grupe SH/g produs uscat, se vor adăuga 4,5ml epiclorhidrină.

Timpul de adăugare a epiclorhidrinei este de 15 min. După terminarea adăugării se acoperă paharul cu o sticlă de ceas și se ridică temperatura amestecului la 60°C prin plasarea vasului de reacție pe o baie de apă, menținându-se astfel, sub agitare, timp de 2 ore. Reticulatul obținut se filtrează la trompă și se spală alternativ cu apă distilată și cu o soluție tampon fosfat de sodiu 0,5M, până la pH=6,25. Se usucă prin filtrare la trompă și se folosește în continuare. Se poate păstra în soluția tampon-fosfat.

B. Obținerea mercaptogelului

Materiale necesare:

- gel reticulat (A);
- tampon fosfat de sodiu 0,5M pH=6,25;
- Na₂S₂O₃ 2M;
- NaHCO₃;
- ditioeritrol;
- EDTA 1mM;
- NaCl 1M;
- tampon acetat de sodiu 0,01M, pH=4.

Mod de lucru:

Gelul reticulat la punctul A se introduce într-un vas prevăzut cu agitator mecanic și se suspendă în 30ml tampon fosfat de sodiu 0,5M pH=6,25, după care se adaugă 30ml soluție de tiosulfat de sodiu 2M. Se continuă agitarea moderată, timp de 6h, la temperatura camerei.

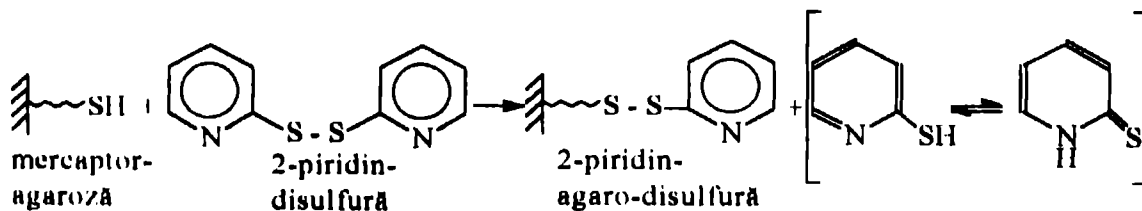
Alchiltiosulfatul obținut se filtrează la trompă și se spală cu apă distilată, după care se aduce la un volum de 60ml prin suspendare în NaHCO₃ 0,1M.

Alchiltiosulfatul gelului se reduce prin adăugarea sub agitare a unei soluții de ditioeritrol în EDTA apos 1mM, astfel încât concentrația sa să fie de 8mg/ml. Din această soluție se iau:

- 4ml, în cazul obținerii unui mercaptogel cu grad redus de substituție cu grupe -SH;
- 50ml soluție de ditioeritrol pentru obținerea unui mercaptogel cu grad ridicat de substituție cu grupe -SH.

Mercaptogelul obținut se filtrează la trompă și se spală pe pâlnie cu 300ml soluție de NaHCO₃ 0,1M în NaCl 1M, care conține 1mM EDTA și final cu o soluție de EDTA 1mM. Gelul se păstrează în soluție tampon (dezaerată) de acetat de sodiu 0,01M, pH=4 (care conține 1mM EDTA).

C. Obținerea 2-piridin-agaro-disulfurii



Materiale necesare:

- gel de mercaptoagaroză cu conținut de 50μmoli grupe SH/g produs uscat (vezi A, B);
- acetona;
- 2-piridin-disulfură 10mg;
- EDTA 1mM.

Mod de lucru:

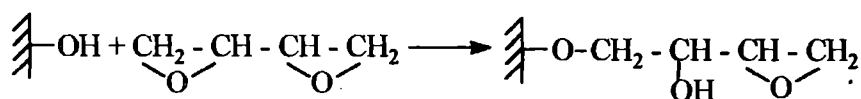
Gelul de mercaptoagaroză cu conținut de aprox. 50 μmoli grupe SH/g produs uscat (punctul A) obținut anterior (punctul B) și păstrat în soluție tampon (B), se filtrează la trompă și se spală în ordine cu 50ml apă distilată și 50ml soluție apoasă de acetonă 50% (v/v). După spălare și filtrare, gelul se suspendă prin agitare în 10ml soluție apoasă de acetonă 50%.

Separat, se dizolvă 100mg 2-piridindisulfură într-o cantitate minimă de acetonă apoasă 50% și se adaugă treptat, sub agitare, la suspensia de gel de mercaptoagaroză, timp de 30 min.

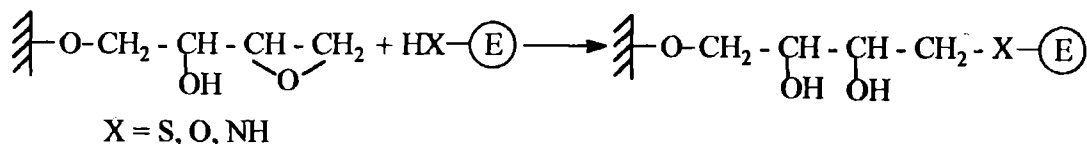
2-piridin-agaro-disulfura obținută se filtrează la presiune redusă și se spală cu acetonă apoasă 50% și cu soluție EDTA 1mM. Se separă prin filtrare la trompă.

I.4.7. Activarea suporturilor polihidroxilice cu bisoxirani

Suporturile polihidroxilice (agaroză, amidon, dextransi, alcool polivinilic etc.) pot fi activate cu 1,4-butandiol-diglicidileter:



Grupa epoxi terminală din gelul astfel activat poate lega enzimele prin intermediul grupelor reactive de pe catenele polipeptidice ale acestora:

**Activarea agarozei 2% cu 1,4-butandiol-diglicidileter****Material necesare:**

- gel de agaroză 2% perlat 10g;
- NaOH 2,5M;
- NaBH₄ 20mg;
- 1,4-butandiol-diglicidileter 1ml;
- acetonă.

Mod de lucru:

Într-un pahar Berzelius de 100ml se introduc 10g gel de agaroză 2% perlat, spălat și uscat prin filtrare la trompă și 5ml soluție NaOH 2,5M. Se pornește agitare; la suspensia formată se adaugă, sub agitare, 20mg NaBH₄ și apoi, în picături, 1ml 1,4-butandiol-diglicidileter.

Se continuă agitarea timp de 6 ore la temperatura camerei, după care gelul activat se separă prin filtrare pe o pâlnie cu masă filtrantă și se spală pe pâlnie cu apă distilată, la presiune redusă, până la reacția neutră a apei de spălare, apoi cu 50ml acetonă și la urmă cu apă distilată.

Gelul de agaroză activat se păstrează la frigider, în apă distilată.

Conținutul mediu în grupe oxiranice (determinat prin titrare cu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) este de 100-120 $\mu\text{moli/g}$ produs uscat.

Se utilizează la imobilizarea chimotripsinei (pag.51).

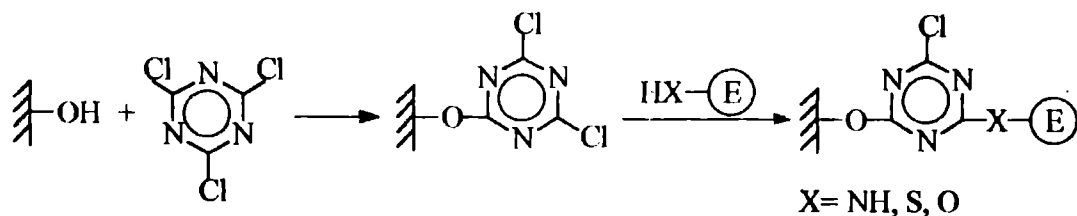
1.5.Obținerea unor celuloze modificate

Celulozele modificate (activate) au fost printre primele suporturi utilizate la imobilizarea proteinelor.

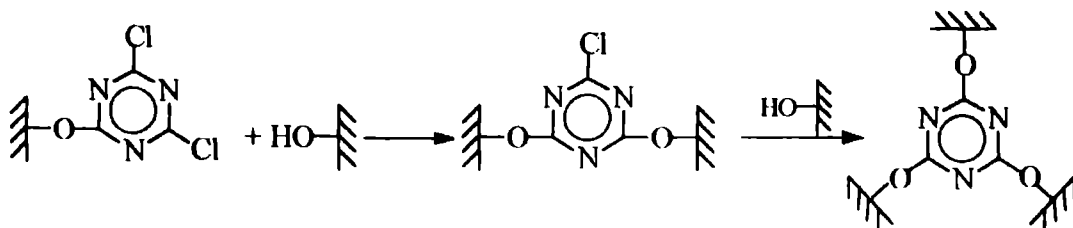
Astfel, CMC (carboximetil-celuloza) sau DEAE-celuloza (dietilaminoetil-celuloza) sunt schimbători de ioni utilizați frecvent la imobilizarea fizică a biocatalizatorilor (enzime, celule viabile, celule moarte etc.) prin legături ionice.

Ca și alte polizaharide, celuloza se poate activa și prin introducerea de grupe imidocarbonat (cu BrCN) sau de halogen reactiv (cu *s*-triclortriazină). *s*-Triclortriazina (clorura de cianuril) este un reactiv mult utilizat pentru funcționalizarea celulozei dar și a agarului, agarozei sau Sephadexului. Cei trei atomi de clor din molecula sa sunt deosebit de reactivi.

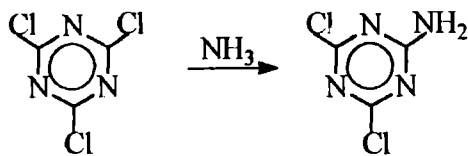
În urma fixării pe suportul polihidroxic, în restul de *s*-triazinil mai rămân doi atomi de halogen reactivi, care pot lega enzima:



Fiind agent polifuncțional, *s*-triclortriazina va reticula parțial suportul:

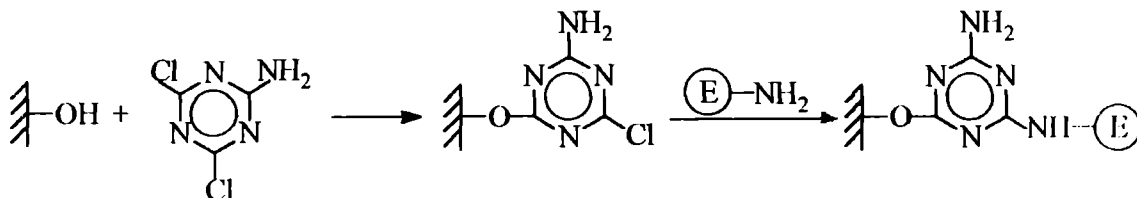


Pentru a restrânge reticularea, este de preferat ca unul din atomii de clor să fie substituit cu grupa NH_2 , mult mai puțin reactivă:



2-amino-4,6-diclor-s-triazina

Urmează apoi funcționalizarea suportului și imobilizarea enzimei:



I.5.1. Prepararea 2-amino-4,6-diclor-s-triazinei

Materiale și aparatură necesare:

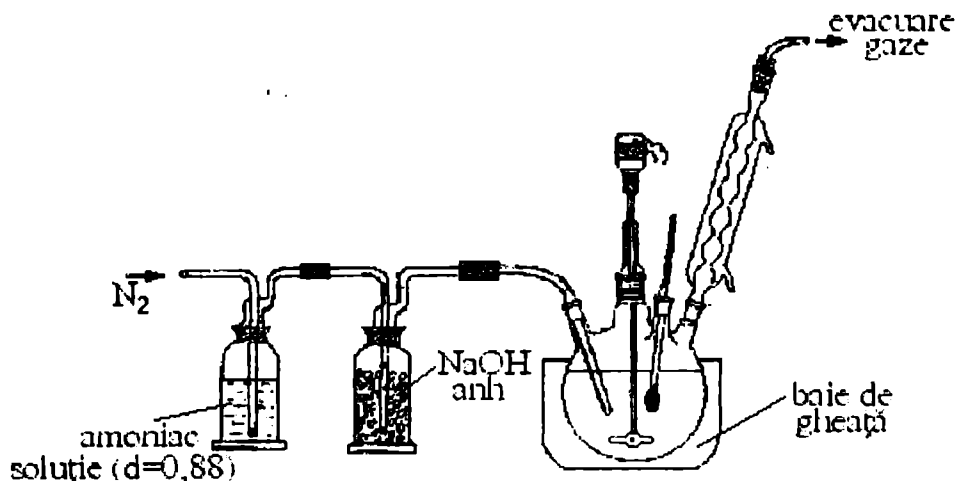
- clorură de cianuril 184g;
- toluen;
- dioxan;
- acetonă;
- amoniac apos (d = 0,88);
- butelie de azot lichefiat;
- rotavapor (evaporator rotativ);
- instalație de distilare la presiune redusă (trompă).

Mod de lucru:

Atenție! Deoarece clorura de cianuril este extrem de toxică, se va lucra într-o nișă cu tiraj bun.

Într-un balon cu 4 găuri, prevăzut cu agitator mecanic, termometru introdus în masa de reacție, tub de barbotare și tub de evacuare a gazelor (figura nr.6) se plasează o soluție formată din 184g clorură de cianuril în 200ml toluen și 1000ml dioxan. Se pornește agitarea și se răcește amestecul de reacție la 5°C, plasând balonul pe o baie de gheață. Se începe barbotarea unui curent de gaz generat prin trecerea azotului printr-o soluție caldă de amoniac (d = 0,88) și uscare printr-o coloană umplută cu NaOH anhidru.

Figura nr.6

Instalație pentru prepararea 2-amino-4,6-diclor-s-triazinei

Se agită amestecul de reacție la 5°C, până la apariția unei suspensii solide de NH_4Cl , care se filtrează la trompă și se spală pe pâlnia Büchner cu 50-100ml amestec benzen-dioxan (1:5 v/v). Filtratele reunite se evaporă la sec, la presiune redusă, într-un evaporator rotativ. Reziduul solid se dizolvă într-un volum minim de amestec apă-acetonă (1:1 v/v), după care acetona se distilă la presiune redusă.

Precipitatul format se filtrează la trompă și se recristalizează rapid (în max. 10 min., pentru evitarea hidrolizei) dintr-un volum minim de apă distilată.

Randament este de aprox. 90%.

1.5.2. Prepararea aminoclor-s-triazinil-derivaților celulozei și celulozelor modificate

Materiale necesare:

- celuloză sau celuloză modificată (CMC, DEAE-celuloză etc.) 10g;
- acetonă;
- 2-amino-4,6-diclor-s-triazină 1g;
- Na_2CO_3 15%;
- HCl 1M;
- HCl conc.;
- tampon fosfat 0,05M (pH=7).

Mod de lucru:

Într-un balon cu trei gâturi, prevăzut cu agitator mecanic, refrigerent de reflux, termometru suspendat prin refrigerent și pâlnie de picurare, se introduce 10g substanță uscată (celuloză, celuloză modificată) și o soluție formată din 1g 2-amino-4,6-diclor-s-triazină în 50ml amestec apă-acetonă (1:1 v/v).

Se agită amestecul pe baie de apă la 50°C (în masa de reacție) timp de 5 min., după care se adaugă prin pâlnia de picurare, 20ml soluție apoasă 15% de Na₂CO₃ și apoi 12ml HCl 1M.

Amestecul se agită încă 5 min. la 50°C, după care se ajustează rapid pH-ul la 7 cu HCl conc.

Produsul solid format se filtrează la vid și se spală de trei ori pe pâlnia Büchner cu câte 200ml amestec acetonă-apă (1:1 v/v), iar final cu o soluție tampon fosfat 0,05M (pH=7). Se păstrează la frigider, la 2°C. Se utilizează pentru imobilizarea enzimelor (pag.52).

I.6. Metode de activare a dextranilor

Dextranii comerciali, reticulați, cunoscuți sub denumirea generică Sephadex, având diferite dimensiuni și porozități ale particulelor de gel, sunt superiori în multe privințe celulozei și amidonului, în calitatea lor de suporturi pentru imobilizarea enzimelor.

S-a observat astfel că, în comparație cu imobilizatele celulozice, enzimele fixate pe Sephadex prezintă o activitate remanentă mult mai mare.

Aceasta se explică prin structura parțial microcristalină a celulozei, din care cauză sunt afectați centrii activi ai moleculelor enzimelor. Pe de altă parte, Sephadexul este mai rezistent la atacul microorganismelor decât amidonul.

Fiind suporturi polihidroxilice, dextranii pot fi activați prin metodele generale utilizate pentru acestea.

I.6.1. Activarea dextranilor cu BrCN

Materiale și aparatură necesare:

- Dextran T-40 5g;
- BrCN 0,25g;
- NaOH 1M;
- pH-metru cu electrod mixt standardizat.

Mod de lucru:

Într-un pahar Berzelius prevăzut cu agitare magnetică se introduc 5g Dextran T-40 (Pharmacia, Suedia), care se dizolvă prin agitare la 20°C în 50ml apă distilată. La această soluție se adaugă o soluție formată prin dizolvarea a 0,25g BrCN în 5ml apă, menținându-se pH-ul la 10,8 prin titrare cu NaOH 1M.

După aprox. 5 min. se consumă toată cantitatea de BrCN. Gelul activat în acest fel se separă prin filtrare la presiune redusă, se spală cu puțină apă distilată și se folosește imediat pentru imobilizarea NAD⁺ și NADP⁺ preactivați.

I.6.2. Activarea Sephadexului G-200 cu BrCN

Această varietate de Sephadex se poate folosi, după activare, pentru imobilizarea α - și β -tripsinei, a chimotripsinei, a carboxipeptidazei etc.

Materiale necesare:

- Sephadex G-200 uscat;
- NaOH 2M;
- BrCN;
- soluții tampon diverse, în funcție de enzima care urmează a fi imobilizată.

Mod de lucru:

O cantitate de Sephadex G-200 uscat (corespunzătoare unei concentrații de 20mg gel/ml apă) se suspendă prin agitare, timp de 24h, în cantitatea de apă respectivă.

După 24h, gelul depus se decantează și se transferă într-un vas prevăzut cu agitator magnetic, un electrod mixt de pH scufundat în masa gelului și conectat la un pH-metru și o biuretă (suspendată deasupra masei de reacție) umplută cu NaOH 2M.

Se începe agitarea și se adaugă o cantitate de BrCN (egală cu cantitatea de suport luată inițial în lucru), sub formă de soluție apoasă de concentrație 25mg BrCN/ml apă. Se ajustează permanent pH-ul la 10, prin titrare cu NaOH 2M, timp de 6 min. (un pH ridicat produce o reticulare prea avansată, suportul nemaifiind accesibil unor molecule voluminoase ca cele de enzime și alte proteine).

Gelul activat se filtrează la presiune redusă și se spală pe pâlnie, în ordine cu: 200ml apă distilată și cu câte 100ml soluții răcite în prealabil, care se aleg în funcție de enzima ce urmează a fi imobilizată, astfel:

- a) pentru α - și β -tripsină și chimotripsină $\text{NaBO}_3 \cdot \text{HCl}$ 0,1M, CaCl_2 0,02M, pH=8,5;
- b) pentru carboxipeptidază: NaHCO_3 0,1M și ZnCl_2 1nM.

Observație: Dacă suportul activat urmează a fi folosit la imobilizarea chimotripsinei, în etapa anterioară, de activare cu BrCN, se va lucra la pH=9,8 sau 10,3 (prin titrare potențiomtrică).

I.6.3. Activarea Sephadexului G-50 cu BrCN

Acest suport se utilizează la co-imobilizarea a trei enzime multisevențiale: malat dehidrogenaza, citrat sintetaza, lactat dehidrogenaza.

Materiale necesare:

- Sephadex G-50 100mg;
- soluție apoasă de BrCN;
- NaOH 4M;
- NaHCO_3 0,1M.

Mod de lucru:

100mg Sephadex G-50 se activează cu BrCN la pH=11, după modul de lucru indicat la paragraful I.6.2., lucrându-se cu 4ml soluție de BrCN, corespunzând unui raport de 25mg BrCN/ml apă.

Reacția de activare la pH=11 are loc timp de 8 min., după care gelul activat se filtrează la presiune redusă pe o pâlnie cu masă filtrantă și se spală cu 200ml soluție NaHCO₃ 1M, răcită în prealabil.

I.6.4. Activarea Sephadexului 200 cu BrCN

Materiale și aparatură necesare:

- Sephadex 200 (uscat);
- NaOH 2M;
- BrCN;
- soluție 0,1M NaBO₃-HCl;
- tampon 0,02M CaCl₂, pH=8,5;
- NaHCO₃ 0,1M;
- ZnCl₂ 1mM;
- pH-metru cu electrod mixt standardizat.

Mod de lucru:

Sephadexul 200 se dispersează în apă distilată, sub agitare magnetică, timp de 24h. Se folosesc 20mg Sephadex/ml apă. Dispersia se introduce într-un balon echipat cu agitator magnetic, un electrod de pH standardizat și scufundat în masa dispersiei și o biuretă de titrare cu NaOH 2M.

Separat, se cântărește o cantitate de BrCN egală cu greutatea Sephadexului luat în lucru și se dizolvă în apă (25mg/ml). Soluția astfel obținută se adaugă treptat la Sephadex, se ajustează pH-ul la 10 și se menține astfel, sub agitare, timp de 6min.

(Atenție! Dacă se lucrează la pH mai mare, cu adăugare manuală de NaOH sau se activează gelul cu BrCN solid, rezultă un grad de reticulare avansat, imobilizatul fiind impenetrabil pentru substraturi cu mase moleculare mari.)

Întrucât acest suport activat poate fi utilizat pentru imobilizarea a mai multor enzime, gelul activat și separat prin filtrare la presiune redusă se va spăla în funcție de acestea, și anume:

- pentru chimotripsină, α - și β -tripsină, în ordine cu: soluție 0,1M NaBO₃-HCl; tampon CaCl₂ 0,02M, pH=8,5;
- pentru carboxipeptidază, în ordine cu: soluție 0,1M de NaHCO₃ și soluție 1mM ZnCl₂.

Se păstrează la frigider (+4°C) în tampon sau apă distilată.

II. METODE DE IMOBILIZARE A UNOR BIOCATALIZATORI

În acest capitol vor fi descrise câteva metode ușor accesibile pentru imobilizarea pe suporturi a unor enzime (chimotripsina, tripsina, papaina, invertaza, fosfataza alcalină, peroxidaza, ureaza), dar și a unor celule (*Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces simplex*), atât prin metode fizice cât și chimice.

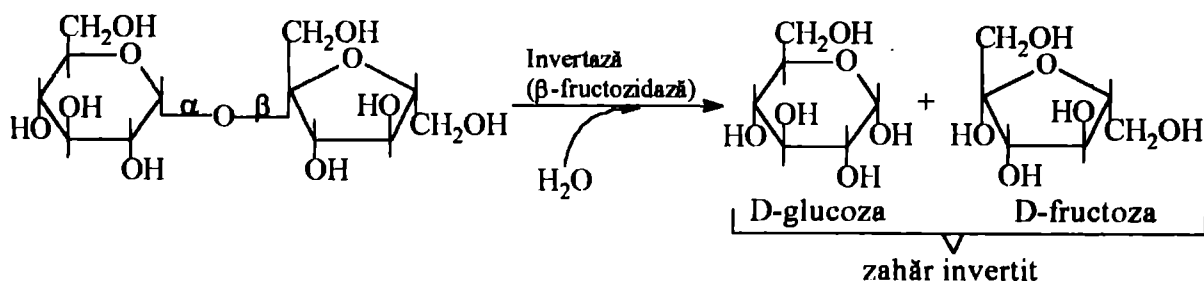
II.1. Imobilizarea invertazei

Invertaza pură ca și cea din drojdie se utilizează în industria produselor zaharoase pentru obținerea zahărului invertit, cu solubilitate crescută, cu proprietăți edulcorante superioare zaharozei și care prezintă avantajul de a nu cristaliza cu timpul în produsele de cofetărie (gemuri, ciocolată, siropuri, lichioruri etc.).

De asemenea, invertaza este folosită și pentru hidroliza unor trizaharide ca: gențianoza sau rafinoza formată ca subprodus în procesul de fabricare a zahărului din sfeclă și care împiedică cristalizarea acestuia, stahioza, dar nu și a polizaharidelor ca amidonul și inulina.

II.1.1. Imobilizarea invertazei pe cărbune activ

Aceasta este o metodă fizică de imobilizare prin adsorbție pe particulele fine de cărbune. Determinarea activității invertazei se bazează pe reacția de scindare a zaharozei în D-glucoză și D-fructoză; zahărul invertit dă o reacție de culoare cu un reactiv specific (acidul dinitrosalicilic). Dozarea se face spectrofotometric:



A. Construirea curbei etalon pentru dozarea activității invertazei

Metoda se bazează pe reacția de culoare a zahărului invertit cu acidul dinitrosalicilic. Intensitatea culorii se măsoară cu un spectrofotometru, la $\lambda=540\text{nm}$.

Materiale necesare:

1° Reactiv cu acid dinitrosalicilic (DNS): Acest reactiv se prepară astfel: 5g acid dinitrosalicilic se omogenizează în mojar cu câteva picături de apă distilată, după care se adaugă treptat 100ml soluție NaOH 1n, până la obținerea unei paste omogene. La această pastă se adaugă treptat, prin omogenizare, 250ml apă și 150g tartrat de Na și K.

Se transferă cantitativ amestecul într-un balon cotel de 500ml și se aduce la semn cu apă distilată. Se păstrează într-o sticlă închisă la culoare.

2°Soluție zaharoză 0,25M în tampon acetat 0,2M (pH=4,5).

3°Soluție de zahăr invertit 0,0025M (amestec în părți egale din soluții 0,0025M de D-glucoză și D-fructoză).

4°Soluție tampon de acid acetic-acetat de sodiu 0,02M (pH=4,5). Se obține prin diluarea tamponului acid acetic-acetat 0,2M (pH=4,5).

Trasarea curbei etalon

În 6 eprubete se pipetează probele indicate în tabelul nr.2:

Tabelul nr.2

Probe pentru trasarea curbei etalon folosită la dozarea activității invertazei

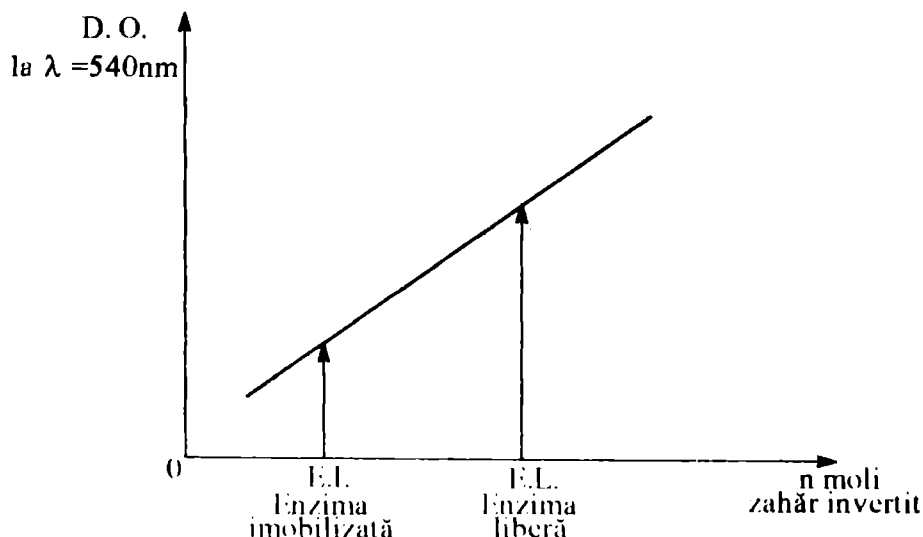
| Proba nr. | ml zahăr invertit | ml apă | n moli zahăr invertit |
|-----------|-------------------|--------|-----------------------|
| 1 | 0 | 1,0 | 0 |
| 2 | 0,1 | 0,9 | 250 |
| 3 | 0,2 | 0,8 | 500 |
| 4 | 0,3 | 0,7 | 750 |
| 5 | 0,4 | 0,6 | 1000 |
| 6 | 1,0 | 0 | 2500 |

În fiecare dintre cele 6 eprubete se mai pipetează și câte 1ml soluție zaharoză 0,25M în tampon acetat, pH=4,5 (reactiv 2°) și câte 2ml reactiv DNS (reactiv 1°).

Probele se incubează 5 min. pe o baie de apă la fierbere. După răcire, se diluează cu apă distilată la 10ml și se colorimetrizează față de apă la 540nm. Se trasează o curbă etalon ca în figura nr.7:

Figura nr.7

Curbă etalon pentru dozarea activității invertazei



B. Imobilizarea invertazei**Materiale necesare:**

- cărbune activ 2g;
- invertază;
- soluție tampon acetat 0,2M (pH=4,5);
- reactiv Fehling:
 - Fehling I: se dizolvă 7g CuSO₄ în 100ml apă;
 - Fehling II: se dizolvă 35g sare Seignette (tartrat dublu de Na și K) și 10,4g NaOH în 100ml apă.

Mod de lucru:

În 4 eprubete de centrifugare se introduc câte 0,5g cărbune activ, peste care se pun cantități crescătoare dintr-o soluție de invertază (5mg enzimă/ml apă distilată), conform tabelului nr.3:

Tabelul nr.3

Imobilizarea pe cărbune activ a unor cantități crescătoare de invertază

| Proba nr. | Cantitatea de soluție de invertază (ml) |
|-----------|---|
| 1 | 0,5 |
| 2 | 1 |
| 3 | 1,5 |
| 4 | 1,8 |

Se adaugă apoi în fiecare probă câte 0,5ml soluție tampon acetat 0,2M (pH=4,5) și câte 5ml apă distilată.

Conținutul eprubetelor se agită cu bagheta timp de 20 min. la 25°C, după care se centrifughează 10 min. Se decantează supernatantul care conține enzimă neimobilizată, depistată cu ajutorul reacției Fehling.

Imobilizatului se reia cu 5ml tampon acetat și 5ml apă distilată, se agită energic și se centrifughează încă 10 min. Se repetă operația de decantare, spălare cu apă și centrifugare, până la îndepărtarea totală a enzimei neimobilizate (reacție Fehling negativă în apa de spălare).

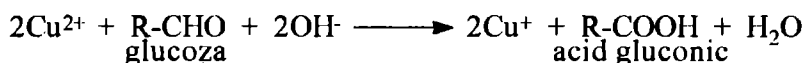
Preparatele de enzimă imobilizată se păstrează la rece, în frigider (+4°C) în câte 5,5ml tampon acetat.

Observație: **Reacția Fehling** (caracteristică grupei CHO) are rolul de a pune în evidență prezența invertazei în apele de spălare ale aducțiilor.

Într-o eprubetă se introduce 5-6ml soluție apoasă de zaharoză 10%, peste care se adaugă 1-2ml din proba de analizat (apa de spălare). Se agită eprubeta și în caz de nevoie se încălzește în mână (la temperatura corpului) timp de 10-15 min., după care se răcește.

Se neutralizează apoi proba cu NaOH 10% sau cu Na₂CO₃ 10% (adăugate cu atenție, în picături) față de turnesol, după care se efectuează testul Fehling.

Pentru aceasta, se prepară reactivul Fehling prin amestecarea în volume egale a reactivilor Fehling I și Fehling II, după care se încălzește la fierbere. Se adaugă câteva picături din proba de analizat pregătită după cum am arătat mai sus, după care se mai fierbe amestecul format încă două minute. Apare un precipitat roșu-cărămiziu de oxid cupros, care indică prezența glucidei reducătoare (glucoza).



Reacția negativă în apa de spălare corespunde absenței invertazei capabile de a hidroliza zaharoza cu formarea glucozei.

C. Determinarea activității invertazei imobilizate

Această determinare se face în funcție de pH.

Materiale necesare:

- soluție de substrat (reactiv 2°, pag.36);
- soluție de enzimă liberă (E.L.) în tampon acetat, pH=4,5 (conține 1mg enzimă);
- reactiv DNS (1°, pag.35);
- enzima imobilizată.

Mod de lucru:

●Pentru enzima liberă:

Se incubă timp de 15 min. pe o baie de apă la fierbere un amestec format din 1ml soluție substrat și 1ml soluție enzimă liberă în tampon acetat 0,25M, pH=4,6. Se procedează la fel pentru enzima liberă în tampon acetat 0,25M, pH=3,6. În ambele cazuri se stopează reacția cu câte 2ml reactiv DNS.

Se ține 5 min. pe baia de apă la fierbere, se răcește, se diluează cu apă distilată la 10ml și se colorimetrează la 540nm.

●Pentru probele cu enzimă imobilizată:

Se fac câte două determinări, la pH=3,6 și pH=4,6.

În două eprubete se pipetează câte: 1ml soluție substrat (zaharoză); 0,25ml imobilizat depus; 0,5ml soluție tampon acetat 0,25M cu pH=3,6 și respectiv pH=4,6.

Se incubă cele două probe timp de 15 min. pe baie de apă la fierbere, după care se filtrează. Din filtrate se iau câte 0,5ml, peste care se pun: 1,5ml soluție tampon acetat 0,25M cu pH=3,6 și respectiv pH=4,6 și câte 2ml reactiv DNS.

Se țin eprubetele pe baia de apă la fierbere, 5 min. Se răcesc, se diluează cu apă la 10ml și se colorimetrează la 540nm față de curba etalon (pag.36).

Observații:

1) În urma incubării, probele capătă o colorație roșie-vișinie închisă, în comparație cu martorul (galben-portocaliu). Pentru a se putea face citirile la spectrofotometru, se diluează la 1/5.

2) În paralel se lucrează și două probe martor (la pH=3,6 și 4,6), modul de lucru fiind asemănător cu cel de la probele cu enzimă solubilă și enzimă imobilizată, doar că reacția enzimatică este stopată la timpul zero, prin introducerea reactivului dinitrosalicilic înaintea preparatului enzimatic.

3) Calculul rezultatelor:

-Pentru enzima liberă (E.L.), activitatea enzimatică (*AE*) se calculează după relația:
 $AE(n \text{ moli zahăr invertit format/ml enzimă/1 min/37}^\circ\text{C}) = n \text{ moli zahăr invertit}_{\text{probă}} -$

$$- n \text{ moli zahăr invertit}_{\text{martor}} \cdot \frac{1}{15}$$

-Pentru enzima imobilizată (E.I.):

$$AE = n \text{ moli zahăr invertit}_{\text{probă}} - n \text{ moli zahăr invertit}_{\text{martor}} \cdot \frac{4}{15}$$

4) În calcularea rezultatelor se va lua în calcul și factorul de diluție al probelor cu enzimă liberă și imobilizată.

II.1.2. Imobilizarea invertazei prin legare ionică pe un suport-schimbător de ioni

În acest tip de imobilizare, între grupele libere fixate lateral pe catenele poliamidice ale proteinei și grupele din molecula suportului se stabilesc legături ionice.

Ca suporturi se folosesc atât polizaharide modificate (CMC, DEAE-celuloză etc.) cât și schimbători de anioni sau cationi sintetici (rășini de tip Vionit sau Amberlit).

Metoda care va fi descrisă poate fi folosită pentru imobilizarea invertazei atât pe CMC cât și pe DEAE-celuloză.

Materiale necesare:

- CMC sau DEAE-celuloză 1g;
- soluții tampon acetat 0,2M (pH=3,6 și pH=4,6);
- invertază 2mg;
- NaCl 5N;
- reactiv Fehling.

Mod de lucru:

În două eprubete gradate se pun câte 0,5g CMC sau DEAF, care se suspendă prin agitare cu o baghetă în câte 5ml soluție tampon acetat 0,2M de pH=3,6 și respectiv 4,6.

Peste suspensiile formate se pipetează câte 1 ml soluție invertază în apă distilată (1mg enzimă/1ml). Conținutul eprubetelor se agită timp de 30 min. la 25°C (eventual prin încălzire în mână).

După expirarea timpului de reacție, gelurile obținute se filtrează la presiune redusă pe o pâlnie cu masă filtrantă și se spală pe pâlnie cu o soluție apoasă de NaCl 5N, până la îndepărtarea totală a enzimei neimobilizate (reacție Fehling negativă în soluția de spălare).

Preparatele obținute se păstrează la frigider (+4°C) în apă distilată sau în NaCl 5N. Se determină activitatea enzimei imobilizate în funcție de cele două pH-uri, după procedeul descris anterior.

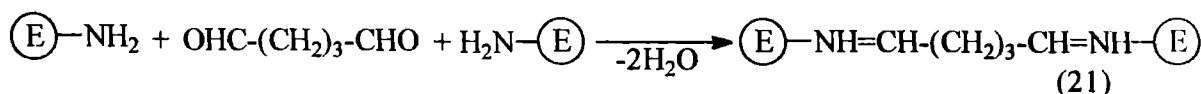
II.1.3.Imobilizarea invertazel prin reticulare

Reticularea este o metodă chimică de imobilizare, prin care enzimele sunt insolubilizate prin reacția cu un reactiv di- sau polifuncțional.

În acest procedeu suportul poate lipsi, insolubilizarea biocatalizatorului fiind rezultatul unei reacții de condensare intermoleculară cu agentul de reticulare.

În alte procedee, se poate co-reticula enzima pe un suport printr-o reacție de condensare simultană a acestora cu reactivul difuncțional.

Unul dintre agenții de reticulare cel mai utilizat, care prezintă și avantajul introducerii unui “spacer” este glutaraldehida, care se condensează cu grupele NH₂ libere ale biocatalizatorului, cu formare de azometine (baze Schiff) de forma (21):



Ca și celelalte metode de imobilizare chimică, care decurg în condiții stresante pentru celulele viabile, reticularea nu se aplică în cazul lor.

În schimb, poate fi folosită cu succes în cazul enzimelor ca și al celulelor moarte, care au conținut crescut de lizină.

În funcție de scopul în care urmează a fi folosit imobilizatul, se pot aplica mai multe variante:

-reticularea în absența suportului;

-co-reticulare enzimă-suport insolubil ca: particule de gel (perle), folii de celofan, fibre de nylon activat etc.;

-co-reticulare enzimă-proteină auxiliară (bogată în grupe NH₂), atunci când enzima conține prea puține resturi de lizină etc.

O reticulare prea avansată poate distorsiona ireversibil structura terțiară a enzimei, producând denaturarea sa, sau poate conduce la rețele macromoleculare tridimensionale prea strânse, îngreunând accesul moleculelor de substrat la centrul activ al enzimei, aductul fiind greu dispersabil.

II.1.3.1. Coreticularea invertazei cu BSA (serum albumină bovină)

Materiale necesare:

- invertază 100mg;
- BSA 75g;
- glutaraldehydă (Atenție! TOXICĂ!);
- reactiv Fehling.

Mod de lucru:

Un amestec format din 100mg invertază și 75mg BSA se tratează, într-un pahar Berzelius, sub agitare magnetică, cu 1ml soluție apoasă 1% de glutaraldehydă, la temperatura camerei. (Dacă amestecul este prea vâscos, se poate omogeniza cu o baghetă.)

După omogenizare, amestecul de reacție se întinde pe o foaie de plastic plasată pe fundul unui vas Pétri. Pentru maturare, gelul se lasă timp de câteva zile la frigider (+4°C).

Se formează o membrană solidă, care se desprinde de pe folia de plastic și se spală cu apă distilată într-o eprubetă, până la îndepărtarea totală a enzimei neimobilizate (reacție Fehling negativă în apa de spălare).

Determinarea activității enzimei imobilizate se face după metoda descrisă anterior, la două pH-uri diferite (3,6 și 4,6).

II.1.3.2. Coreticularea invertazei cu gelatina

Pentru evitarea unei reticulări prea avansate a enzimei, aceasta se co-reticulează cu hidrolizatul de colagen prin intermediul glutaraldehydei. În acest caz, gelatina joacă rol de proteină auxiliară.

Se obțin imobilizate în formă de filme (membrane), care pot fi folosite atât în reactoare cu membrană de ultrafiltrare, cât și în bioreactoare cu pat compact sau în procedeul "batch".

Materiale necesare:

- invertază 100mg;
- gelatină (soluție apoasă 10%);
- soluție 25% de glutaraldehydă 0,1ml;
- reactiv Fehling.

Mod de lucru:

Într-un pahar Berzelius se dizolvă 100mg invertază într-un volum minim de soluție apoasă de gelatină 10%, la 30°C, pe o baie de apă (Atenție! Se va nota cantitatea în ml de soluție de gelatină adăugată, pentru a se evalua conținutul în mg enzimă/ml soluție.). Se adaugă, sub agitare cu o baghetă, 0,1ml soluție apoasă 25% de aldehydă glutarică. Se omogenizează bine amestecul de reacție și se toarnă pe o folie de plastic aplicată pe fundul unui vas Pétri. Se acoperă vasul și se congelează reticulatul timp de 4-12 ore, după care se aduce treptat la temperatura camerei.

Se desprinde membrana de reticulat și se spală cu apă distilată, pentru îndepărtarea glutaraldehidei nereacționate (reacție Fehling negativă în apa de spălare).

Determinarea activității enzimei imobilizate la pH=3,6 și pH=4,6 se face conform metodei descrise mai înainte (pag.38).

II.1.4. Interpretarea și compararea variației activității enzimatică a invertazei imobilizate prin metodele descrise

După imobilizarea invertazei prin cele patru variante descrise anterior (paragrafele II.1.1., II.1.2. și II.1.3.) și determinarea activității enzimatică a imobilizatelor la două pH-uri diferite (3,6 și 4,5) se va întocmi un tabel comparativ cu următoarele rubrici:

Tabelul nr.4

| Nr. crt. | Preparat enzimatic | AE (activitatea enzimatică a invertazei) | | Activitatea remanentă pentru imobilizate (%) | |
|----------|--|--|--------|--|--------|
| | | pH=3,6 | pH=4,6 | pH=3,6 | pH=4,6 |
| 1 | Enzima liberă | | | 100 | 100 |
| 2 | Enzima adsorbită pe cărbune activ | | | | |
| 3 | Invertaza legată ionic pe CMC sau pe DEAE-celuloză | | | | |
| 4 | Enzima coreticulată cu BSA și glutaraldehydă | | | | |
| 5 | Enzima coreticulată cu gelatină și glutaraldehydă | | | | |

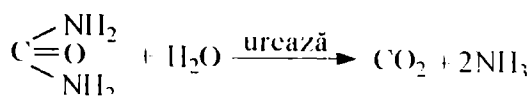
Din datele înregistrate, considerând că activitatea enzimei libere este de 100%, se va aprecia:

a) care dintre metodele de imobilizare conduce la un agregat cu activitate reziduală mai mare și

b) care este pH-ul optim de reacție pentru enzima liberă și enzima imobilizată.

II.2. Metode de imobilizare a ureazei

Ureaza catalizează descompunerea hidrolitică a ureei, având o specificitate absolut de substrat:



Imobilizatele de urează se utilizează în special la construcția sensorilor enzimatici pentru dozarea ureei în lichidele biologice ca și în dispozitivele extracorporale (de dializă) pentru îndepărtarea ureei din sânge.

II.2.1. Imobilizarea ureazei pe gelatină

Metoda este asemănătoare cu cea descrisă la invertază (paragraful II.1.3.2.), constând în coreticularea cu aldehidă glutarică.

Materiale necesare:

- urează 100mg;
- soluție apoasă de gelatină 10%;
- glutaraldehidă-soluție apoasă 25% 0,1ml;
- reactiv Fehling.

Mod de lucru:

Într-un pahar Berzelius se dizolvă prin agitare cu o baghetă 100mg urează într-o cantitate minimă de soluție de gelatină 10%, la 30-40°C (se va nota cu precizie volumul de soluție de gelatină utilizat, pentru a se determina conținutul în mg enzimă/ml soluție) pe o baie de apă. În soluția astfel obținută se adaugă 0,1ml soluție apoasă 25% de glutaraldehidă.

După o bună omogenizare, amestecul de reacție se toarnă pe o folie de plastic plasată pe fundul unui vas Pétri. Se acoperă vasul și se congelează 4-12 ore. Gelul congelat se aduce treptat la temperatura camerei, se desprinde și se spală cu apă distilată, până la îndepărtarea totală a aldehidei în exces (reacție Fehling negativă în apa de spălare). Se păstrează la frigider, sub apă distilată.

II.2.2. Imobilizarea ureazei prin coreticulare cu glutaraldehidă pe BSA

Metoda se aseamănă cu cea descrisă la imobilizarea invertazei (II.1.3.1.)

Materiale necesare:

- urează 100mg;
- BSA 75mg;
- soluție apoasă 1% de glutaraldehidă 1ml;
- reactiv Fehling.

Mod de lucru:

Într-un pahar Berzelius se introduc 100mg urează și 75mg BSA, peste care se adaugă 1ml soluție apoasă 1% de glutaraldehidă. Amestecul format se omogenizează bine prin amestecare cu o baghetă la temperatura camerei, după care se toarnă pe o folie de plastic plasată pe fundul unui vas Pétri. Se acoperă vasul și se păstrează în frigider (la max. +4°C), până la formarea unei membrane (7-10 zile). Se desprinde membrana de pe folie și se spală cu apă distilată până la îndepărtarea totală a aldehidei nereacționate (reacție Fehling negativă în apa de spălare). Se păstrează la frigider, în apă distilată.

II.2.3.Imobilizarea ureazel pe collagen

Colagenul, proteină inertă și biocompatibilă, dar fără valoare alimentară, este un suport convenabil pentru imobilizarea biocatalizatorilor (enzime, culturi de celule, celule deshidratate etc.).

Datorită elasticității ridicate a collagenului, imobilizatelor obținute li se pot da diverse forme (membrane, filme, filamente etc.), pretându-se la utilizări multiple, de la bioreactoare la biosensori. Se pot aplica toate cele trei metode de imobilizare caracteristice (complexarea macromoleculară, co-reticularea cu glutaraldehidă sau electrodepunerea), în funcție de natura biocatalizatorilor ca și de scopul final în care urmează a fi folosit imobilizatul.

Metoda cea mai simplă este complexarea macromoleculară care constă în includerea enzimelor în collagen, urmată de obținerea membranei, sau în impregnarea membranelor preformate de collagen cu soluții de enzime. Procedul, pur fizic, se bazează pe formarea unor interacții proteină-proteină și este aplicabil și culturilor de celule, nefiind nociv pentru acestea.

Co-reticularea enzimă-collagen în prezența unui agent difuncțional (de obicei glutaraldehidă), deși conferă imobilizatelor o stabilitate mai mare, este distructivă pentru celulele vii, fiind folosită în special pentru imobilizarea enzimelor.

Se pretează imobilizării pe collagen enzime ca: ureaza, invertaza, catalaza, β -galactozidoza, glucozoxidaza etc.

Un parametru caracteristic enzimelor imobilizate pe collagen este "capacitatea de încărcare" prin care se înțelege activitatea enzimatică a enzimei imobilizate raportată la 1g de complex enzimă-collagen.

În tabelul nr.5 sunt indicate câteva valori ale "capacității de încărcare" pentru o serie de membrane de tip enzimă-collagen.

Tabelul nr.5

"Capacitățile de încărcare" ale unor membrane de tip collagen-enzimă

| Nr. crt. | Enzima | Activitatea specifică a enzimei libere (U/mg proteină) | "Capacitatea de încărcare" a complexului collagen-enzimă (U/g complex) |
|----------|------------------------|--|--|
| 1 | Catalaza | 3000 | 7140 |
| 2 | β -Galactozidaza | 50 | 3500 |
| 3 | Lisosim | 8500 | 2500 |
| 4 | Papaina | 12,7 | 600 |
| 5 | Glucozoxidaza | 118 | 475 |
| 6 | Invertaza | 100 | 450 |
| 7 | Asparaginaza | 300 | 200 |
| 8 | Ureaza | 10 | 250 |

II.2.3.1. Co-reticularea urezei cu colagenul

Materiale și aparatură necesare:

- colagen 2g;
- acid acetic glacial;
- NaOH 0,1N;
- urează 200mg;
- glutaraldehydă (soluție apoasă 25%) 0,2ml;
- reactiv Fehling;
- pH-metru cu electrod mixt standardizat.

Mod de lucru:

2g colagen se omogenizează bine cu o cantitate minimă de acid acetic glacial, până la formarea unei paste semifluide, după care se neutralizează (printr-o biuretă) cu o soluție apoasă de NaOH 0,1N la pH=6, sub agitare, în prezența unui pH-metru. Amestecul astfel obținut se diluează cu apă distilată, într-un balon cotat, până la o concentrație finală (în colagen) de 1% (Atenție: se vor nota volumele de acid acetic și de soluție de NaOH 0,1N folosite pentru a se putea deduce volumul de apă necesar diluării).

Dispersia de colagen astfel formată se introduce într-un pahar Berzelius și se adaugă 200mg urează. Se omogenizează amestecul, după care se adaugă treptat, sub agitare, 0,2ml soluție 25% de glutaraldehydă. Amestecul format se toarnă în strat uniform pe o folie de plastic sau de aluminiu plasată pe fundul unui vas Pétri.

Se acoperă și se lasă la frigider pentru formarea unei membrane (7-10 zile).

Membrana formată se desprinde de pe folie și se spală de repetate ori cu apă distilată, până când apa de spălare nu mai prezintă reacția Fehling. Membrana se păstrează în frigider, sub un strat de apă distilată.

Observație: În varianta complexării macromoleculare, enzima se adugă direct la dispersia de colagen, se agită amestecul și se trage sub formă de membrană. Deoarece în dispersie colagenul macromolecular există în starea sa nativă microfibrilară, el poate participa la interacții cu moleculele enzimei, aceste interacții fiind facilitate de etapa ulterioară de uscare a membranei, care apropie razele moleculare ale celor două proteine.

Ca procedeu, la dispersia de colagen obținută în modul descris mai sus se adaugă cantitatea dorită de enzimă (sub formă de soluție într-un volum minim de apă distilată). Raportul cantitativ enzimă/colagen poate varia între 0,1-0,3 (în greutate, față de producții uscați). Amestecul se omogenizează bine, după care se transformă în membrană, iar aceasta se prelucrează prin metoda descrisă anterior.

II.2.3.2. Determinarea cantității de enzimă legată pe colagen

În cazul imobilizatorilor pe colagen, cantitatea de enzimă legată nu poate fi determinată prin metodele uzuale de analiză a proteinelor, apărând interferențe cu suportul și cu o proteină.

Cum însă majoritatea enzimelor conțin cantități apreciabile de triptofan și cisteină, aminoacizi absenți în colagen, se folosesc două metode de analiză: determinarea triptofanului și (sau) a cisteinei.

A. Determinarea enzimei legate prin analiza triptofanului

Metoda se bazează pe reacția de culoare a triptofanului cu reactivul cu *p*-dimetil-aminobenzaldehidă, determinările fiind spectrofotometrice (în raport cu o curbă etalon trasată anterior).

Materiale necesare:

- NaOH 1N 1ml;
- H₂SO₄ 21,4N 9ml;
- *p*-dimetil-aminobenzaldehidă 30mg;
- NaNO₂ 0,04% (soluție proaspăt preparată) 0,1ml;
- membrana colagen-enzimă (obținută prin complexare macromoleculară) 20-30mg (produs uscat).

Mod de lucru:

Cantitatea de membrană luată în probă se taie mărunț și se dizolvă în 1ml NaOH soluție 1N. La amestecul format se adaugă, pe rând, în mici porțiuni, sub agitare și răcire exterioară cu gheață: 9ml H₂SO₄ soluție 21,4N și 30mg *p*-dimetil-aminobenzaldehidă. Amestecul se lasă apoi în repaus timp de o oră, la întuneric.

După trecerea acestui timp, se adaugă în amestec, sub agitare, 0,1ml soluție apoasă de NaNO₂ 0,04%; apare o colorație albastră.

După 30 min. se citește absorbanta amestecului la 600nm, folosind un spectrofotometru. În paralel se citește și absorbanta pentru o probă martor, care se obține prin procedeul descris mai sus, dar fără *p*-dimetil-aminobenzaldehidă.

Curba etalon se construiește utilizând 9-10 concentrații diferite de enzimă solubilă (cu care se lucrează în modul descris mai înainte pentru membrana de imobilizat), pe care se interpolează proba.

Observații:

1) Membranele "albe" de colagen (care nu conțin enzimă) nu prezintă o absorbanta detectabilă.

2) În cazul membranelor obținute prin corecturare cu glutaraldehidă, modul de lucru este asemănător, dar se va aplica o inversiune în etapele determinării și anume:

-proba de membrană se incubează în 9ml H₂SO₄ 21,4N la întuneric, până la dizolvare completă. Acest stadiu este preliminar tratării cu soluția de NaOH 1N;

-în continuare, se adaugă soluția de NaOH 1N și apoi *p*-dimetil-aminobenzaldehida.

Se lucrează apoi mai departe conform procedurii descris pentru membrane obținute prin complexare macromoleculară.

B. Determinarea enzimei legate prin analiza cisteinei

Metoda reprezintă o modificare a procedurii Roston, în care cisteina, tratată cu o cantitate echimoleculară de noradrenocrom conduce la un produs specific stabil, de culoare galbenă, care se determină colorimetric. Alți compuși care conțin grupe -SH nu reacționează în condițiile respective.

Materiale necesare:

- norepinefrină 400mg;
- acid ascorbic 7,6mM 1ml;
- fericianură de potasiu 7,6mM 1ml;
- NaHSO₃ 1,9mM;
- tampon fosfat de sodiu 0,1M, pH=7,5;
- probă de membrană collagen-enzimă.

Mod de lucru:

1° Prepararea reactivului:

Pentru formarea noradenocromului, se procedează astfel: la un amestec format din 2ml (400mg) norepinefrină, 5ml tampon fosfat de sodiu 0,1M, pH=7,5, și 15ml apă distilată se adaugă 1ml soluție apoasă de fericianură de potasiu 7,6mM. Se agită pentru o bună omogenizare; formarea noradenocromului este completă după 2 min., când apare o colorație galben-roz. Colorația galbenă, datorată excesului de fericianură, se îndepărtează prin adăugarea a 1ml soluție apoasă de acid ascorbic 7,6mM. Rămâne colorația roz specifică noradenocromului.

Stabilitatea acestui reactiv este un factor critic al metodei. Cum pentru fiecare test cu proba de analizat (conținând cisteină) ce va fi descris în continuare se utilizează aprox. 0,13ml reactiv (corespunzând la aprox. 2mg norepinefrină), se recomandă ca între două determinări reactivul să se păstreze în frigider.

Colorația galbenă, datorată excesului de fericianură, trebuie îndepărtată atent și complet prin tratare cu acid ascorbic. De aceea, se recomandă ca la prepararea reactivului cu noradenocrom să se lucreze într-un vas Erlenmeyer de 50ml, cu agitare mecanică, pentru asigurarea unui contact intim al substanțelor folosite.

2° Testele cu probele de analizat:

• Pentru determinarea cisteinei din enzima liberă, se va folosi o soluție proaspătă formată prin dizolvarea enzimei în 10ml apă distilată (aprox. 10^{-8} M enzimă), iar din această soluție se iau pentru un test 2ml.

Cei 2ml probă de analizat se tratează cu 0,13ml reactiv cu noradenocrom. Se agită amestecul, se observă apariția colorației galbene formată în urma reacției cisteinei cu noradenocromul. Colorația atinge un maxim al intensității după 7 min., rămânând stabilă alte 8 min. În perioada de stabilitate a culorii, după 10 min. de la amestecarea probei de analizat cu reactivul, se adaugă câteva picături de soluție apoasă de NaHSO_3 1,9mM și se agită amestecul. După 0,5-1 min. de la adăugarea bisulfidului se măsoară absorbanta probei la 415nm, cu ajutorul unui colorimetru. Folosind probe cu concentrații crescătoare de enzimă liberă, se observă o creștere liniară și rapidă a absorbantei cu concentrația cisteinei din probă, până la atingerea unui palier corespunzând unei concentrații de $3 \cdot 10^{-8}$ M enzimă în probele testate.

Atenție! Testul este foarte sensibil la variațiile de pH ale mediului.

• Pentru determinarea cisteinei dintr-o membrană enzimă-colagen, enzima și suportul se vor hidroliza în prealabil la aminoacizii componenți.

Hidroliza se realizează acoperind cu o soluție apoasă de NaOH 10M membrana obținută prin imobilizare, fin mărunțită. Amestecul se incubă 96 ore la 4°C , cu agitare ocazională. Se obține o soluție limpede, al cărei pH se corectează la 7,5 prin titrare cu HCl 10M (obligatoriu cu ajutorul unui pH-metru).

Din soluția rezultată se iau pentru analiză 5ml. Modul de determinare a cisteinei din probă este identic cu cel descris anterior, pentru probele de enzimă liberă.

Cantitatea de enzimă reținută prin imobilizare pe colagen se deduce în raport cu o curbă etalon trasată anterior cu probe de soluții apoase de enzimă liberă, de concentrații cuprinse între 10^{-8} și $3 \cdot 10^{-8}$ enzimă.

II.2.4. Determinarea activității ureazei imobilizate în funcție de concentrația substratului

Metoda se aplică pentru toate imobilizatele a căror obținere a fost descrisă anterior (paragrafele II.2.1., II.2.2. și II.2.3.) și constă în dozarea colorimetrică a NH_3 pus în libertate prin hidroliza enzimatică a ureei.

Reactivi necesari:

-soluție tampon fosfat 0,6M, pH=7;

-reactiv Nessler (vezi anexa);

-standard: 2,643g sulfat de amoniu dizolvat în 500ml apă distilată (conține 80μmoli NH_4 /ml);

-substrat: soluții de uree 1-6% în tampon fosfat 0,6M, pH=7;

-HCl 1N.

Mod de lucru:

În 5 eprubete se pipetează câte 1ml soluție substrat de concentrații crescânde: 1%, 2%, 3%, 4% și 6%.

Se introduce membrana de enzimă imobilizată în prima eprubetă. Reacția are loc prin agitarea eprubetei la temperatura camerei, timp de 5 min. După expirarea acestui timp se scoate imobilizatul (care se spală de 2-3 ori cu apă distilată înainte de a-l introduce în următoarea eprubetă cu soluție de substrat), apoi se adaugă la probă 1ml HCl 1N.

Din amestecul de reacție se iau 1-3ml peste care se adaugă 7-8ml apă distilată și 1ml reactiv Nessler. Se agită și se citește absorbanta la $\lambda=480\text{nm}$.

În paralel, se efectuează o probă martor, lucrând cu 1ml soluție standard (în loc de soluție de substrat) și fără enzimă.

Se fac determinări similare și pentru celelalte probe, cu concentrații crescute de substrat.

Calculul activității enzimatică (AE) se face după relația:

$$AE = \frac{A_{480} \text{ probă} / \text{min} \times \text{dilu} \text{ ț ie} \times 80}{A_{480} \text{ s tan dard} \times \text{mg enzimă} / \text{ml}}$$

unde: A_{480} =absorbanta citită la 480nm.

Se alcătuieste un tabel de tipul următor:

Tabelul nr.6

| Proba nr. | Concentrația soluției de substrat (%) | $A_{480\text{nm}}$ | Activitate enzimatică |
|-----------|---------------------------------------|--------------------|-----------------------|
| 1 | 1 | | |
| 2 | 2 | | |
| 3 | 3 | | |
| 4 | 4 | | |
| 5 | 6 | | |

Se va trasa și graficul variației activității enzimatică în funcție de concentrația substratului.

Anexă:

Reactiv Nessler

a)Substanțe necesare:

-HgCl₂ 6g;

-KI 12,4g;

-KOH 20g.

b) Prepararea reactivului:

Se dizolvă 6g HgCl_2 în 50ml apă distilată și se încălzește soluția pe baie de apă la 80°C , după care se adaugă o soluție formată din 7,4g KI în 50ml apă.

Se omogenizează și se răcește amestecul, după care se filtrează la trompă, pentru separarea HgI_2 precipitată, care se spală de câteva ori pe pâlnia Büchner cu apă, pentru îndepărtarea urmelor de KI adsorbită.

Urmează dizolvarea HgI_2 și trecerea sa în complex mercuric. Pentru aceasta, se ia precipitatul de HgI_2 cu o soluție formată prin dizolvarea a 5g KI într-o cantitate minimă de apă distilată și se introduce totul într-un balon cotat de 100ml, la care se adaugă 20g KOH dizolvat într-un volum minim de apă.

Se răcește soluția formată și se aduce la 100ml cu apă distilată. După depunerea precipitatului solid format ca o opalescență, se sifonează supernatantul într-un flacon de culoare închisă, care se păstrează la întuneric.

II.2.5. Aprecieri comparative

După imobilizarea ureazei prin cele trei metode descrise (paragrafele II.2.1., II.2.2. și II.2.3.), se va întocmi un tabel comparativ:

Tabelul nr.7

Variația activității enzimice a ureazei imobilizate, în funcție de concentrația substratului

| Metoda de imobilizare | Concentrația soluției de substrat (%) | Activitate enzimatică |
|---------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| Co-reticulare cu gelatină | 1 | |
| | 2 | |
| | 3 | |
| | 4 | |
| | 6 | |
| Co-reticulare cu BSA | 1 | |
| | 2 | |
| | 3 | |
| | 4 | |
| | 6 | |
| Includere în colagen | 1 | |
| | 2 | |
| | 3 | |
| | 4 | |
| | 6 | |

Pe baza acestui tabel, se vor trage concluzii asupra metodei de imobilizare care conduce la obținerea aductului cu cea mai ridicată activitate enzimatică.

II.3. Metode de imobilizare a chimotripsinei

Chimotripsina, o endopeptidază obținută prin activarea chimotripsinogenului din pancreasul de porc, are aplicații multiple în special în scindarea amestecurilor racemice ale unor esteri aromatici optic activi, ca și în sinteza unor peptide (aspartam, glutation), în reacția plasteinelor etc.

Cele mai utilizate metode de imobilizare pe suporturi a chimotripsinei sunt cele chimice, de legare covalentă pe suporturi preactivate (în special pe cele cu structură polihidroxilică) și prin reticulare cu reactivi polifuncționali.

II.3.1. Imobilizarea chimotripsinei pe agaroză și agaroză activată

II.3.1.1. Imobilizarea pe gel de agaroză 2% activat cu oxirani

Gelul de agaroză 2% a fost perlat și activat cu 1,4-butandiol-diglicidileter (pag.28).

Materiale necesare:

- gel oxiranic de agaroză 2%, perlat și activat;
- NaHCO₃ 0,5M;
- α -chimotripsină;
- tampon borat de sodiu 0,1M, pH=8,5 (în NaCl 1M);
- tampon acetat de sodiu 0,1M, pH=4,1 (în NaCl 1M);
- tampon aceta de sodiu 0,01M, pH=4,1.

Mod de lucru:

10g gel de agaroză 2%, perlat, uscat și activat cu 1,4-butandiol-diglicidileter (pag.), depus și filtrat, se suspendă sub agitare magnetică în 25ml NaHCO₃ 0,5M, iar în suspensia agitată se adaugă 50mg chimotripsină. Reacția decurge timp de 5 ore, sub agitare, la temperatura camerei.

Imobilizatul obținut se separă prin filtrare la presiune redusă și se spală pe pâlnia Büchner, în ordine, cu următoarele soluții:

- tampon borat de sodiu 0,1M, pH=8,5 (în NaCl 1M);
- tampon acetat de sodiu 0,1M, pH=4,1 (în NaCl 1M);
- tampon acetat de sodiu 0,01M, pH=4,1.

Imobilizatul se păstrează în ultimul tampon, la 4°C. Conținutul în enzimă al aductului este de aprox. 50mg proteină/g produs uscat.

Activitatea enzimatică a aductului, determinată față de o soluție 0,01M de ester etilic al N-acetil-L-tirozinei în KCl 0,05M este optimă la pH=9,3 și reprezintă 20% din cea a enzimei native, față de același substrat, la pH=7,9.

II.3.1.2. Imobilizare pe Sepharoză 6B activată cu *p*-benzoehinonă

Ca suport se folosește un gel perlat (reticulat sau nu), de Sepharoză 6B, preactivată cu benzoehinonă (pag.20).

Materiale necesare:

- chimotripsină 150mg;
- gel depus și activat de Sepharoză 6B 10ml;
- tampon fosfat de sodiu pH=8 (0,1M);
- glicină 1g;
- tampon acetat de sodiu 1M, pH=4 (0,01M);
- NaHCO₃ 0,1M, pH=8,5;
- KCl 1M.

Mod de lucru:

Într-un flacon de 150ml se omogenizează sub agitare magnetică un amestec format din 150mg chimotripsină și 10ml gel depus, activat, de Sepharoză 6B în 20ml tampon fosfat de sodiu 0,1M, pH=8. Reacția durează 24 ore la temperatura camerei, cu agitare ocazională.

Pentru îndepărtarea excesului de grupe chinonice se adaugă în amestecul de reacție 1g glicină și se mai lasă încă 24 ore la temperatura camerei, agitând ocazional. Gelul format se filtrează la presiune redusă și se spală pe pânle, în ordine, cu următoarele soluții:

- acetat de sodiu 1M, pH=4;
- NaHCO₃ 0,1M, pH=8,5;
- KCl 1M,

și în final cu apă distilată.

Imobilizatul se păstrează la frigider (+4°C), în apă distilată; aductul conține aprox. 100mg enzimă/g material uscat.

Față de esterul etilic al N-acetil-L-tirozinei (ca substrat), activitatea enzimatică remanentă a imobilizatului este de 78% (din activitatea enzimei native).

Prin același procedeu se poate imobiliza și ribonucleaza, activitatea sa remanentă fiind de 97% față de 2,3-difosfatul citidinei ca substrat.

II.3.2.Imobilizarea chimotripsinei pe celuloze modificate cu s-triazine

Materiale necesare:

- celuloză activată sub formă de derivat amino-clor-s-triazinic (pag.31), uscată prin filtrare la trompă;
- NaOH 0,1N;
- tampon fosfat 0,05M, pH=8;
- tampon fosfat 0,05M, pH=8 în NaCl 1M;
- tampon fosfat 0,05M, pH=7.

Mod de lucru:

Pentru a se asigura o legare cât mai puternică a enzimei, se va lucra cu un raport enzimă-suport uscat corespunzând unei soluții de enzimă în tampon de concentrație 5g/l și 10-50g suport.

O suspensie de celuloză activată sub formă de derivat amino-clor-s-triazinic în tampon fosfat 0,05M, pH=7 se ajustează, sub agitare magnetică, cu NaOH 0,1N la pH=8.

La această suspensie se adaugă sub agitare soluția de chimotripsină în tampon fosfat 0,05M, pH=8. Se continuă agitarea blândă la 20°C, timp de 18 ore. Imobilizatul se filtrează la trompă și se spală pe pânna Büchner, în ordine cu:

- tampon fosfat 0,05M, pH=8;
- tampon fosfat 0,05M, pH=8 în NaCl 1M;
- tampon fosfat 0,05M, pH=8.

Enzima imobilizată se stochează în ultimul tampon, la +2°C.

Observații:

1) Dacă se utilizează ca suport CMC activat sub formă de derivat amino-1-clor-triazinic, randamentul imobilizării enzimei este de 48%, iar activitatea remanentă a imobilizatului este de 46%.

2) Determinarea activității chimotripsinei imobilizate se face față de esterul etilic al N-acetil-L-tirozinei ca substrat (pag.55).

II.3.3. Imobilizarea chimotripsinei prin reticulare cu glutaraldehidă

Chimotripsina poate fi reticulată direct cu aldehida glutarică, sau co-reticulată cu un suport insolubil activat cu grupe $-NH_2$.

II.3.3.1. Reticularea directă

Materiale necesare:

- α -chimotripsină pulbere 500mg;
- tampon acetat 0,2M, pH=6, sau
- tampon fosfat 0,1M, pH=6,8;
- soluție apoasă 2,5% de glutaraldehidă;
- lizină sau etanolamină.

Mod de lucru:

Varianta A

500mg chimotripsină se dizolvă în 5ml soluție tampon acetat 0,2M, pH=6 (sau tampon fosfat 0,1M, pH=6,8).

Peste soluția astfel formată se adaugă, în picături, sub agitare magnetică, 2ml soluție apoasă 2,5% de glutaraldehidă. Reticulatele cu cele mai înalte activități enzimatică se obțin cu concentrații de 0,3-0,6% de glutaraldehidă în amestecul de reacție.

Amestecul de reacție se agită 1-3 ore la temperatura camerei. Se observă, după 10-30 min., apariția unui gel.

După epuizarea timpului de reacție, gelul obținut se filtrează, se dispesează prin agitare energetică în apă distilată și se spală la presiune redusă, pe pâlnia Büchner până la îndepărtarea totală a aldehidei glutamice nereacționate și a enzimei nereticulate (ambele se depistează în apa de spălare la $\lambda=280\text{nm}$).

Varianta B

Gelul obținut prin reticulare după metoda descrisă la varianta A, se introduce într-o seringă metalică și se dispersează sub agitare în apă distilată, prin picurare cu ajutorul acului seringii. Dispersia obținută se centrifughează timp de 15 min., iar gelul decantat se resuspendă în apă.

Operația de centrifugare și spălare cu apă distilată se repetă până ce supernatantul (apa de spălare) nu mai prezintă absorbție la 280nm.

Imobilizatul obținut fie pe calea A, fie pe calea B, se suspendă peste noapte în 20ml soluție de lizină (sau de etanolamină) 0,1M în tamponul utilizat la reticulare (acetat 0,2M, pH=6 sau fosfat 0,1M, pH=6,8), după care se spală cu apă distilată, prin filtrare la presiune redusă sau respectiv, prin centrifugare.

Aductul se păstrează la frigider, în apă distilată.

Metoda de imobilizare poate fi folosită și la tripsină (tabelul nr.8), dar este indicată pentru chimotripsină, când se obțin imobilizate cu activitate remanentă mult mai mare, în special la pH=5.

Tabelul nr.8

Activitatea enzimatică a chimotripsinei și a tripsinei bovine reticulate cu glutaraldehidă

| Enzima | pH-ul reticulării | Activitatea enzimatică a enzimei libere (U.I./mg) | Activitatea enzimei imobilizate (U.I./mg) | Activitatea remanentă |
|---------------|-------------------|---|---|-----------------------|
| Tripsină | 5 | 42 | 8 | 19 |
| | 7 | 42 | 7,4 | 17,6 |
| Chimotripsină | 5 | 243 | 138 | 56,8 |
| | 7 | 243 | 106 | 43,6 |

II.3.3.2.Co-reticularea chimotripsinei cu aminoetilceluloză (AEC) și glutaraldehidă

Acesta este un exemplu de reticulare a enzimei în prezența unui suport insolubil, activat cu grupe NH_2 (AEC).

Materiale necesare:

- AEC 10g;
- NaOH 0,5M;

- tampon fosfat 0,05M, pH=7;
- glutaraldehydă;
- NaCl 1M în tamponul fosfat.

Mod de lucru:

Înainte de reticulare, aminoetilceluloza se spală prin dispersare în NaOH 0,5M (20ml soluție NaOH/g AEC uscată). Se filtrează la presiune redusă și se spală pe pânne cu apă distilată, până la reacția neutră a apei de spălare.

10g AEC spălată și uscată prin filtrare la presiune redusă se dispersează sub agitare magnetică într-o soluție de tampon fosfat 0,05M, pH=7, aducându-se la un volum total de 240ml cu tamponul.

În dispersia astfel formată se adaugă treptat și sub agitare, 20ml soluție apoasă de glutaraldehydă 25% (greutate/volum). Se agită amestecul de reacție 2 ore la temperatura camerei, după care se filtrează la presiune redusă și se spală pe pânne, de 5 ori, cu câte 100ml tampon, pentru îndepărtarea aldehidei nereacționate.

Gelul-suport filtrat după spălare se resuspendă în aprox. 100ml soluție tampon fosfat 0,05M, pH=7, iar în dispersie se adaugă, sub agitare moderată, o cantitate de enzimă corespunzând unui raport de 100mg chimotripsină/g AEC reticulată cu glutaraldehydă, dizolvată într-o cantitate minimă de apă distilată. Se aduce volumul total al amestecului de reacție la 200ml cu soluție tampon fosfat și se continuă agitarea la temperatura camerei, 2 ore.

După terminarea reacției, se filtrează reticulatul la presiune redusă și se spală repetat cu o soluție de NaCl 1M în tamponul fosfat utilizat la reticulare, până la îndepărtarea totală a enzimei neimobilizate (absența maximului de absorbție la 280nm în soluția de spălare).

Imobilizatul filtrat se păstrează la frigider, în apă distilată.

Prin aceeași metodă se pot co-reticula pe AEC tripsina și β -galactozidaza. Imobilizatul cu tripsină are o activitate enzimatică remanentă de 75%.

II.3.4.Determinarea activității chimotripsinei libere și imobilizate

Metoda se bazează pe saponificarea enzimatică a esterului etilic al clorhidratului tirozinei (TEE·HCl) la pH=6,25, la 25°C. Ionii H⁺ rezultați sunt titrați potențiomtric.

Materiale și aparatură necesare:

- TEE·HCl 6,1425g;
- NaCl 14,6125g;
- NaOH 1N și 0,02N;
- α -chimotripsină liberă sau imobilizată;
- pH-metru cu electrod mixt standardizat;
- cronometru.

Mod de lucru:**a) Pregătirea substratului**

Într-un balon cotat de 1000ml se dizolvă 6,1425g ester (TEE·HCl) și 14,6125g NaCl în 500ml apă distilată. Se adaugă 25ml NaOH 1N, se agită și se completează la semn cu apă distilată.

b) Hidroliza enzimatică a substratului

Într-un vas de reacție de 100-150ml, cu pereți dubli, se pipetează 40ml soluție de substrat TEE·HCl și se termostatează la $25^{\circ}\text{C} \pm 0,10$. După echilibrarea temperaturii din vas, se ajustează soluția la $\text{pH}=6,25$ prin titrare cu NaOH 0,1N, sub agitare magnetică.

Se adaugă 1ml soluție apoasă de α -chimotripsină 0,05% (sau o cantitate corespunzătoare de imobilizat care conține echivalentul în greutate de α -chimotripsină). Se continuă agitarea și se pune imediat în funcțiune un cronometru..

PH-ul amestecului de reacție se corectează la $6,25 \pm 0,10$ prin titrare cu NaOH 0,02N. Se fac trei determinări, luându-se media lor.

Activitatea enzimatică a chimotripsinei se exprimă prin formula:

$$U/mg = \frac{v \cdot C}{G}, \text{ în care:}$$

v = valoarea medie a numărului de ml de NaOH 0,02N consumați la titrare în decurs de un minut;

C = 0,02 (concentrația în milimoli de ioni COO^- neutralizați de 1ml NaOH 0,02N);

G = cantitatea în mg de chimotripsină luată în lucru.

O bună activitate enzimatică se înscrie în intervalul 0,036-0,044 U/mg.

II.4. Imobilizarea pepsinei pe agaroză aminată

p-Fenildiamino-agaroză obținută în modul descris la pag.22, poate reacționa cu enzimele în prezența izocianatilor ("reacția celor patru componente").

În cazul pepsinei, aceasta se leagă de suport prin intermediul grupelor $-\text{COOH}$ libere din resturile de α -aminoacizi dicarboxilici din lanțul polipeptidic.

Materiale necesare:

- p*-fenildiaminoagaroză 10g;
- acetaldehidă 250 μ l;
- pepsină 250mg;
- ciclohexilizocianat 250 μ l;
- HCl 1N;
- tampon citrat de sodiu 0,1M (în NaCl 1M), pH= 4;

- tampon citrat de sodiu 0,01M, pH=4;
- tampon acetat de sodiu 0,1M (în NaCl 1M), pH=5,4.

Mod de lucru:

Într-un flacon se suspendă 10g *p*-fenildiamino-agaroză uscată în 40ml apă distilată, sub agitare magnetică moderată. La această suspensie se adaugă 250 μ l acetaldehidă, continuând agitarea încă 15min. La sfârșitul acestei perioade de timp se adaugă la amestecul de reacție 250mg pepsină dublu recristalizată, amestecată în prealabil cu 250 μ l ciclohexilizocianat. Se continuă agitarea și se menține pH-ul amestecului la 5,6-6,0 (prin titrare cu HCl 1N), timp de 6 ore.

Produsul de reacție se filtrează la presiune redusă și se spală pe pâlnia Büchner, în ordine, cu:

- tampon citrat de sodiu 0,1M (în NaCl 1M), pH=4;
- tampon acetat de sodiu 0,1M (în NaCl 1M), pH=5,4 și
- tampon citrat de sodiu 0,01M, pH=4.

Imobilizatul de pepsină se păstrează la frigider (la +4°C) în ultimul tampon, la care se adaugă și 0,02% azidă de sodiu.

Aductul obținut conține în medie 150-190mg pepsină/g produs uscat.

Activitatea proteolitică a pepsinei imobilizate se determină prin metoda Anson (pag.67).

II.5.Imobilizarea β -amilazei pe oxoagaroză, cu ciclohexilizocianat

Reacția celor patru componente poate fi aplicată și la imobilizarea unor enzime pe un gel perlat și reticulat de agaroză 2% (pag.6), oxidat parțial la oxoagaroză cu metaperiodat de sodiu (pag.24).

Materiale necesare:

- oxoagaroză 10g;
- tampon acetat de sodiu 0,4M, pH=6,5;
- β -amilază 100g;
- ciclohexilizocianat 200 μ l;
- tampon acetat de sodiu 0,01M în NaCl 0,5M, pH=4,8;
- amidon;
- acetat de sodiu 0,01M, pH=4,8;
- acetat de sodiu 0,01M.

Mod de lucru:

10g oxoagaroză uscată (obținută prin oxidarea agarozei 2% perlate și reticulate) se suspendă prin agitare magnetică moderată în 20ml tampon acetat de sodiu 0,4M, pH=6,5.

La dispersia formată se adaugă 100mg β -amilază dizolvată în 5ml apă distilată și amestecată cu 200 μ l ciclohexilizocianat.

Amestecul de reacție se agită ușor la temperatura camerei, timp de 6 ore, după care se filtrează imobilizatul la presiune redusă și se spală pe pâlnia Büchner, în ordine, cu următoarele soluții:

- acetat de sodiu 0,4M, pH=6,5;
- acetat de sodiu 0,01M în NaCl 0,5M, pH=4,8;
- acetat de sodiu 0,01M, pH=4,8, la care s-a adăugat 0,5% amidon;
- acetat de sodiu 0,01M.

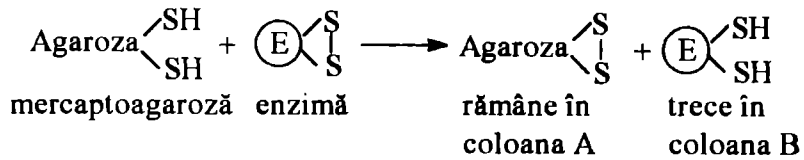
Activitatea remanentă a enzimei din imobilizat față de o suspensie apoasă 0,5% de amidon la pH=4,8 este de aprox.40%.

Aductul obținut astfel poate fi folosit în instalațiile de zaharificare a amidonului, având o stabilitate operațională superioară enzimei native. Astfel, s-a observat că în timp ce β -amilaza activă incubată cu suspensia de amidon 0,5% la 60°C își diminuează dramatic activitatea după 25 de zile, imobilizatul își păstrează o activitate de 95% în aceeași perioadă de timp.

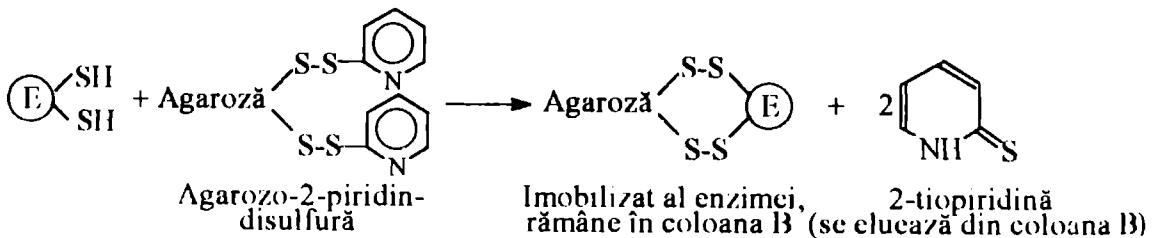
II.6.Imobilizarea amilo-1,6-glucozidazei pe gel de mercaptoagaroză activat

Se lucrează cu două coloane legate în tandem, ca în figura nr.8.

•Reacția care are loc în *coloana A*:



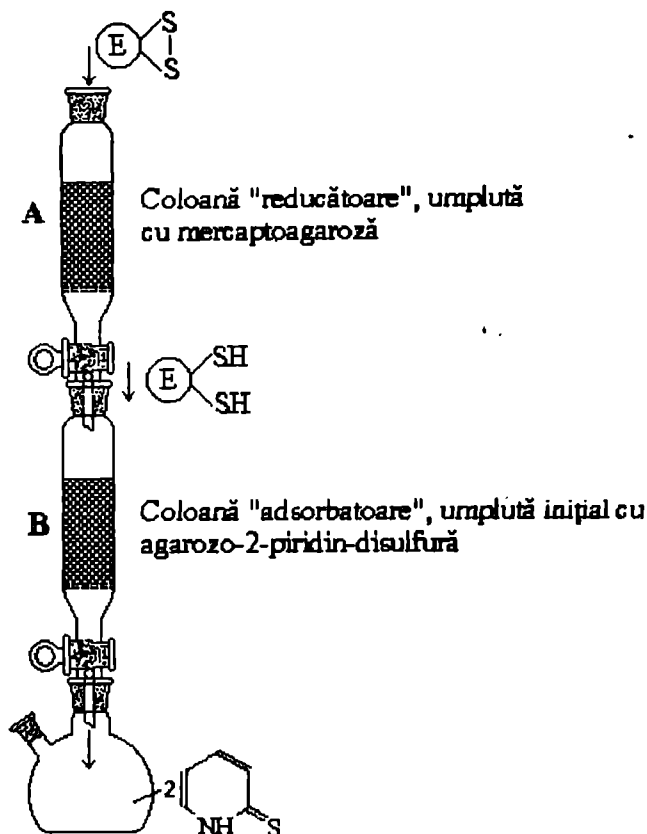
•Reacția care are loc în *coloana B*:



(E) enzima (amilo-1,6-glucozidaza)

Figura nr.8

Sistem de coloane pentru imobilizarea amilo-1,6-glucozidazei



Materiale necesare:

- gel depus de mercaptoagaroză 17ml;
- gel depus de agarozo-2-piridin-disulfură 3,2ml;
- amilo-1,6-glucozidază 41,4mg;
- soluție de NaHCO₃ 1M, în EDTA 1mM;
- tampon acetat de sodiu 1M, pH=4,8;
- amidon;
- tampon acetat de sodiu 0,01M, pH=4,8;
- EDTA.

Mod de lucru:

Se utilizează două coloane din sticlă, cu lungimea de 25-30 cm și diametrul de aprox. 1cm, prevăzute la bază cu frite pe care se așează un strat subțire de vată minerală (figura nr.8).

Coloana A se încarcă cu 17ml gel depus de mercaptoagaroză (conținând 700μmoli SH/g gel uscat), iar coloana B – cu 3,2ml gel depus de agarozo-2-piridin-disulfură.

În coloana A se adaugă 2ml soluție formată prin dizolvarea a 41,4mg amilo-1,6-glucozidază în 6ml soluție NaHCO_3 0,1M (în EDTA 1mM).

Soluția de enzimă este urmată în ordine de:

- 20ml soluție de NaHCO_3 1M (în EDTA 1mM);
- tampon acetat de sodiu 1M, pH=4,8;
- 30ml acetat de sodiu, conținând 1% amidon;
- 30ml acetat de sodiu 0,01M, pH=4,8.

ATENȚIE!

Pentru ca reacțiile să decurgă cantitativ, este obligatoriu ca soluțiile să se adauge cu un debit de alimentare al coloanei A de aprox.10ml/oră.

La sfârșitul experimentului, enzima imobilizată va rămâne în coloana B, care este gata pentru a fi folosită.

II.7.Imobilizarea unor biocatalizatori prin encapsulare

Microencapsularea este o metodă fizică de imobilizare a enzimelor, celulelor sau organelor celulare, ca și a extractelor celulare brute, a unor soluții de enzime în hemolizate de globule roșii etc.

Biocatalizatorii se includ astfel în celule artificiale, de dimensiuni foarte mici, cu membrane semipermeabile sintetice sau naturale.

În funcție de metoda de encapsulare utilizată, se pot obține microcapsule de mărimi variabile, cu diametre cuprinse între 50 μm și 1mm, cu aplicabilitate multiplă în terapia medicală, de la implantări intracorporale (aplicații locale sau injecțiuni) pentru tratamentul unor deficiențe enzimatice sau dereglări metabolice ale organismului, până la dispozitivele extracorporale de dializă.

Metoda generală de encapsulare constă în dispersarea soluției sau a suspensiei apoase de biocatalizator într-un solvent nemiscibil cu apa, în prezența unui stabilizator de emulsii (emulgator).

Membrana semipermeabilă, sintetică, a microcelulei poate fi preformată sau se poate forma "in situ" prin copolimerizarea unor monomeri (acrilici, vinilici, uretanici etc.) sau prin policondensare (membrane de tip nylon), în emulsia care conține catalizatorul de imobilizat.

Encapsularea este în ultimă instanță o variantă a includerii enzimelor în geluri polimere, dar prezintă față de aceasta din urmă avantajul retenției în microcapsule a unor cantități mult mai mari de biocatalizatori.

Membranele sintetice cele mai utilizate sunt cele poliamidice, de tip nylon, ca nylon 610:



O serie de enzime ca: ureaza, fosfataza alcalină, catalaza, anhidraza carbonică etc. se pot microencapsula pe această cale, folosind “metoda picăturilor”.

Metoda generală de encapsulare în membrane de nylon

Material necesare:

-soluție de hemoglobină 10%: 1g hemoglobină dializată se dizolvă în 10ml apă distilată, după care se filtrează pe o hârtie Wattman 42. Se pot folosi și hemolizate proaspete de globule roșii, conținând 10g hemoglobină/100ml;

-soluție (suspensie) de biocatalizator: enzima (sau un amestec de enzime multisevențiale), extractul celular, celulele sau amestecurile de enzime și alte materiale (coenzime, hormoni etc.) se dizolvă sau se suspendă prin agitare magnetică moderată în soluția de hemoglobină (10g/100ml). Soluțiile sau suspensiile obținute trebuie să aibă o concentrație de 10% în soluția de hemoglobină;

-soluția alcalină de hexametildiamină (stoc 1): 4,4g 1,6- hexametildiamină, 1,6g NaHCO₃ și 6,6g Na₂CO₃ se dizolvă în apă distilată, într-un balon cotat, până la un volum total de 100ml. Soluția obținută se filtrează și se păstrează în frigider, la +4°C, se poate folosi după 24ore;

-soluție stoc 2: se prepară prin amestecarea a 40ml cloroform cu 160ml ciclohexan;

-clorură de sebacil 0,018M: se obține adăugând 0,4ml clorură de sebacil la soluția stoc 2, cu două minute înainte de utilizare (Atenție! Sticla de clorură de sebacil odată deschisă, conținutul se deteriorează rapid);

-emulgator de tip apă în ulei: se folosesc 50ml Tween 20, sau nonilfenol etoxilat cu 4 moli de etilenoxid (NF 40), sau alt emulgator de tip apă în ulei.

Mod de lucru:

Encapsularea se efectuează într-un flacon de sticlă de 150ml, prevăzut cu agitator magnetic, cu magnet de 4cm lungime.

Clorura de sebacil dizolvată în soluția stoc 2, împreună cu emulgatorul, se plasează în flaconul de sticlă. În caz că se lucrează cu enzime sau alte materiale de encapsulat în absența hemoglobinei, se amestecă materialul respectiv, direct, cu 3ml soluție alcalină stoc 1.

În cazul în care se folosește hemoglobina, enzima (sau alt material de encapsulat) se adaugă la un amestec format din 1,5ml soluție stoc 1 și 1,5ml soluție de hemoglobină 10%.

Deci, în ambele cazuri, enzimele sau alte materiale ce urmează a fi encapsulate se utilizează în fază apoasă, în soluția stoc 1.

3ml din această fază apoasă (ce conține substanța de encapsulat) se plasează într-o seringă de sticlă (Atenție! Plasticul poate fi atacat de hexametildiamină), prevăzută cu un ac de oțel, care se alege în funcție de diametrul microcapsulelor ce urmează a se obține.

Sub agitare magnetică, se picură conținutul seringii în soluția organică a clorurii de sebacil, prin plasarea acului la aprox. 1cm apropiere de suprafața acesteia.

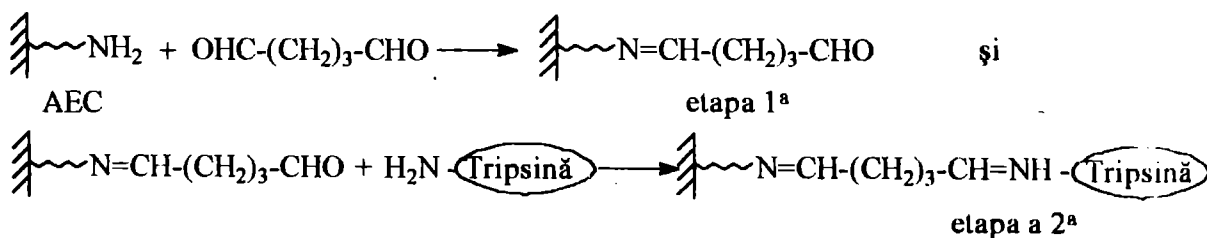
După terminarea adăugării conținutului seringii se mai agită moderat încă 5 min., pentru definitivarea reacției. Microcapsulele cu membrană semipermeabilă de nylon se separă prin decantarea supernatantului. Urmele de solvenți din microcapsule se îndepărtează prin evaporare la presiune redusă, într-un exicator (Atenție! Urmele de solvenți organici pot degrada membrana microcapsulelor). Microcapsulele obținute se păstrează în frigider, într-o soluție apoasă de NaCl.

II.8. Metode de imobilizare a tripsinei

Tripsina poate fi imobilizată atât fizic cât și covalent. Datorită caracteristicilor structurale ale acestei enzime utilizate la conversia unor substrat cu molecule mari, se folosesc mai ales metoda legării ionice, cea a imobilizării covalente pe suporturi preactivate, ca și metoda coreticulării enzimei cu suportul.

II.8.1. Imobilizarea prin coreticulare cu glutaraldehidă pe aminoetilceluloză (AEC)

Coreticularea care are loc în acest caz este o reacție în două etape:



Materiale necesare:

- AEC 10g;
- tripsină;
- NaOH 0,5M;
- tampon fosfat 0,05M, pH=7;
- glutaraldehidă;
- soluție NaCl 1M.

Mod de lucru:

AEC comercială se pretratează prin spălare cu o soluție de NaOH 0,5M (20ml soluție/g AEC uscat) și apoi cu apă distilată, prin spălări repetate pe o pâlnie Büchner la presiune redusă, până ce apă de spălare prezintă un pH neutru

Etapa 1^a (activarea AEC)

Într-un flacon gradat de 500ml, prevăzut cu agitare magnetică se introduc 10g AEC pretrată, suspendată într-o soluție tampon fosfat 0,05M, pH=7, până la un volum total de 240ml. Se începe agitarea și se adaugă 20ml soluție apoasă de glutaraldehidă (25% greutate/volum). Se continuă agitarea timp de 2 ore la temperatura camerei. Suportul celulozic activat se filtrează la presiune redusă și se spală pe pâlnia Büchner de 5 ori cu câte 100ml soluție tampon fosfat 0,05M, pH=7, pentru îndepărtarea glutaraldehidei nereacționate.

Etapa 2^a (fixarea enzimei)

AEC activată, spălată și filtrată se suspendă, în flaconul gradat, în 20ml soluție tampon fosfat, la care se adaugă sub agitare soluția sau suspensia enzimei obținută dintr-o cantitate de enzimă corespunzând unui raport de 100mg tripsină/g AEC modificată, într-un volum minim de tampon fosfat.

Volumul total al amestecului de reacție se aduce la 200ml cu tamponul fosfat 0,05M, pH=7. După o agitare blândă timp de 2 ore la temperatura camerei, se filtrează imobilizatul la presiune redusă și se spală de câteva ori cu tamponul fosfat conținând un volum egal de NaCl 1M, pentru îndepărtarea enzimei neimobilizate.

O imobilizare optimă a enzimei se realizează cu o concentrație de cel puțin 1% și cel mult 10% greutate/volum de glutaraldehidă/AEC luată în reacție.

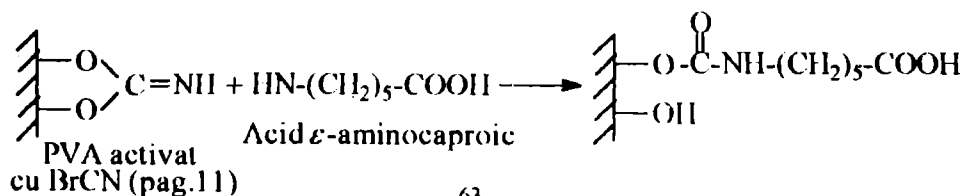
Activitatea enzimatică remanentă a imobilizatului de tripsină este de 75%, iar conținutul în enzimă al aductului este de aprox. 70mg/g material uscat; din enzima supusă imobilizării, este reținută o cantitate de 63%.

Se observă o creștere a stabilității termice a enzimei imobilizate, ca și o deplasare a pH-ului optim de reacție a acesteia.

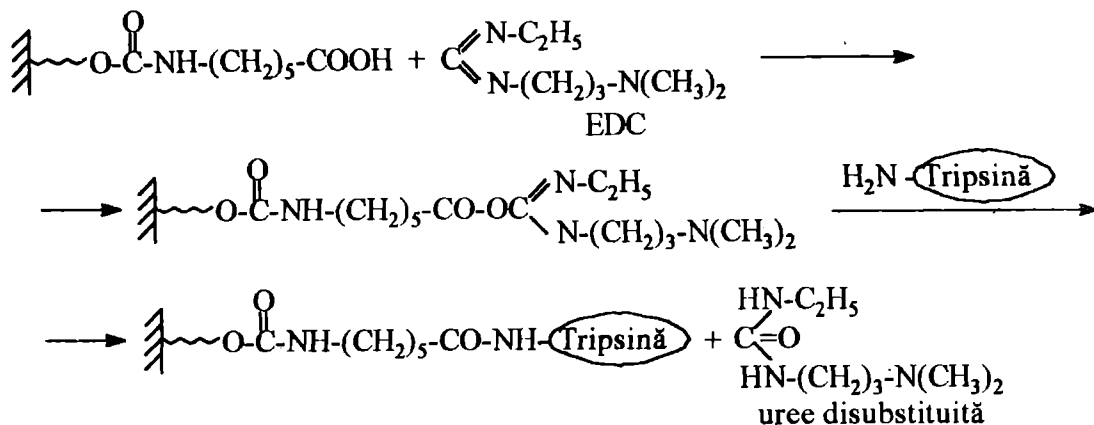
II.8.2. Imobilizarea tripsinei prin legare covalentă pe alcool polivinilic reticulat

Această metodă se utilizează mai ales în cazul în care imobilizatul urmează a fi folosit ca suport afin pentru izolarea unor inhibitori naturali ai tripsinei, prin cromatografie de afinitate. Deoarece atât tripsina cât și inhibitorii săi naturali sau alte substraturi specifice sunt molecule voluminoase, se recomandă ca enzima să nu fie legată direct pe suprafața suportului, pentru a se evita împiedicările sterice, care limitează drastic difuzia substratului la centrul activ al enzimei.

De aceea, alcoolul polivinilic (PVA) activat cu BrCN va fi cuplat cu acid ϵ -aminocaproic, pentru introducerea unui "spacer" cu grupe -COOH terminale:



Etapa propriu-zisă de imobilizare constă în cuplarea suportului astfel activat cu grupele $-NH_2$ libere din molecula tripsinei, în prezența unei carbodiimide ca EDC:



Produsul secundar al reacției (ureea disubstituită) este solubil în apă, fiind îndepărtat prin spălare.

Materiale necesare:

- gel perlat de PVA reticulat cu epichlorhidrină (pag.4), activat cu BrCN (pag.11) și funcționalizat cu catene carboxi-terminale (pag.18) 20ml;
- tripsină 40mg;
- EDC 200mg;
- HCl 0,1N;
- NaCl 0,5M.

Mod de lucru:

10ml gel perlat de PVA reticulat cu epichlorhidrină, activat cu BrCN și funcționalizat cu grupe $-COOH$ terminale se introduc într-o capsulă, împreună cu 20ml soluție apoasă conținând 40mg tripsină și 200mg EDC. Se agită amestecul cu o baghetă și se aduce la $pH=4,0-6,0$, prin ajustare cu câteva picături de HCl 0,1N. Se acoperă capsula și se lasă amestecul de reacție peste noapte, în frigider, la $+3-+4^\circ C$.

A doua zi se filtrează imobilizatul la presiune redusă și se spală pe pâlnia Büchner, alternativ, cu apă distilată și o soluție de NaCl 0,5M, pentru îndepărtarea impurităților.

Imobilizatul astfel obținut conține 0,32mg proteină/ml gel, având o activitate proteolitică remanentă de 75% și o activitate esterazică remanentă de 92% (față de BAEE-esterul etilic al *N*-benzoilargininei).

II.8.3.Determinarea activității proteolitice a tripsinei imobilizate

Principiul general de determinare a activității proteolitice a tripsinei constă în aceea că proteinele nedegradate de tripsină dintr-o probă de substrat se precipită cu acid tricloracetic 5%. În filtrat, se determină proteinele digerate, folosind reactivul Folin-Ciocalteu. Metoda Kunitz utilizează ca substrat caseina, iar metoda Anson-hemoglobina.

Determinările se fac colorimetric, măsurând intensitatea culorii din filtratul cu proteine degradate, tratat cu reactiv. Activitatea enzimatică se estimează față de o curbă-etalon trasată anterior.

A. Metoda Kunitz

O unitate de activitate proteolitică (1UP) reprezintă cantitatea de enzimă (în g sau ml) care digeră o soluție de caseină 2%, cu o viteză care să permită obținerea într-un minut a unei cantități de produs solubil în CCl_3COOH , care prezintă aceeași colorație cu reactivul Folin-Ciocalteu, pe care o dă $1\ \mu\text{mol}$ de tirozină.

Materiale necesare:

- substrat: soluție de cazeină 2%;
- gel perlat de tripsină imobilizată, depus 0,5ml;
- soluție de CCl_3COOH 5%;
- soluție de Na_2CO_3 0,5M;
- reactiv Folin-Ciocalteu (diluat la 1/2).

Acest reactiv se obține astfel:

Într-un balon cu fund rotund, de 2l, prevăzut cu refrigerent de reflux se introduc, în ordine: 100g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și 25g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, care se dizolvă în aprox. 700ml apă distilată. La soluție se adaugă 50ml H_3PO_4 85% și 100ml HCl conc. și se refluxează amestecul pe baie de aer, timp de 10ore. După terminarea refluxării, se adaugă la amestec 150g LiSO_4 dizolvat parțial în 50ml apă și câteva picături de brom.

Se fierbe amestecul 15 min. fără refrigerent, se aduce la temperatura camerei prin răcire, se toarnă în 1000ml apă distilată și se filtrează. Filtratul de culoare galbenă se păstrează într-o sticlă brună, etanșă, la frigider (+4°C). Atenție! Reactivul se oxidează ușor, culoarea sa virând spre verde.

Înainte de întrebuințare, se diluează o parte reactiv + 10 părți apă distilată.

Mod de lucru:

Într-o eprubetă se introduc 2ml soluție de cazeină 2% și se termostatează timp de 10 min. la 30°C. Se adaugă apoi în eprubetă 0,5ml gel perlat de tripsină imobilizată și se porneste cronometrul. Se plasează eprubeta pe o baie de apă și se agită timp de 10 min., la 37°C.

După scurgerea acestui timp, reacția se stopează cu 4ml soluție CCl_3COOH . Se agită și se mai lasă încă 20 min. pe baia de apă.

Conținutul eprubetei se filtrează într-o altă eprubetă (uscată) și se ia din filtrat 1ml, peste care se adaugă 5ml soluție Na_2CO_3 0,5M. Se adaugă apoi repede, sub agitare, 1ml reactiv Folin-Ciocalteu. Se lasă 20 min. pentru apariția culorii albastre și se colorimetrează la 670nm.

În paralel, se lucrează în același mod o probă martor, în care soluția de acid tricloroacetic se adaugă înaintea preparatului enzimatic.

Curba etalon:

Pentru trasarea curbei etalon se folosește o soluție stoc de tirozină 1mM, din care se iau următoarele diluții (diluarea se face cu apă distilată):

Tabelul nr.9

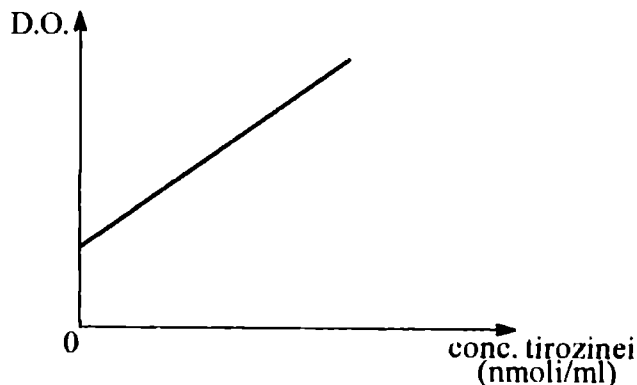
Probe pentru trasarea curbei etalon în metoda Kunitz

| Soluție stoc (ml) | Volum final (ml) | Concentrația finală în tirozină (μmoli/ml) |
|-------------------|------------------|--|
| 1 | 50 | 0,02 |
| 2 | 50 | 0,04 |
| 3 | 50 | 0,06 |
| 4 | 50 | 0,08 |
| 5 | 50 | 0,10 |
| 6 | 50 | 0,12 |
| 7 | 50 | 0,14 |
| 8 | 50 | 0,16 |
| 9 | 50 | 0,18 |
| 10 | 50 | 0,20 |

Din aceste soluții se ia câte 1ml și se adaugă peste fiecare câte 5ml soluție Na₂CO₃ 0,5M și imediat câte 1ml reactiv Folin-Ciocalteu diluat la 1/2. În paralel se lucrează și o probă oarbă (a 11^a) cu apă distilată, în loc de soluție stoc de tirozină.

Cele 11 eprubete se lasă pe baie de apă, 20 min., la 37°C, pentru apariția culorii, după care se citesc densitățile optice (D.O.) la 670nm. Se trasează o curbă etalon de forma:

Figura nr.9



Activitatea proteolitică (A_p) se calculează conform relației:

$$A_p = \frac{E \times 4 \times V \times dil.}{E.T. \times 15 \times v}, \text{ în care:}$$

- V = volumul balonului în care se prepară soluția de enzimă (50ml);
 v = volumul probei luate în analiză (0,5ml imobilizat);
15 = durata hidrolizei (în min.);
4 = volumul amestecului de reacție (în ml);
dil. = diluția (%);
 $E.T.$ = echivalent de tirozină;
 E = D.O. (densitatea optică, extincția, absorbanta) măsurată ($E = E_{\text{probă}} - E_{\text{martor}}$).

B. Metoda Anson

Tripsina catalizează hidroliza compușilor rezultați prin denaturarea hemoglobinei cu uree. Producții de reacție rezultați prin denaturare sunt dizolvați în acid tricloracetic. În soluția astfel obținută se determină conținutul în tirozină și triptofan cu reactivul Folin-Ciocalteu.

Materiale necesare:

1° Soluția de substrat. Se obține prin dizolvarea unui amestec format din: 2g hemoglobină, 36g uree și 8ml NaOH 0,5N în 80ml apă distilată. Se lasă în repaus 60 min. la temperatura camerei. Se adaugă la soluția de substrat 10ml soluție de acid boric 1M în NaCl (obținută prin dizolvarea a 6,184g acid boric și 0,292g NaCl în 100ml apă distilată) și 4,4ml soluție de CaCl_2 5%. Se ajustează pH-ul amestecului cu HCl 1N la 7,5, după care se aduce totul la 100ml cu apă distilată.

2° NaOH soluție 0,5N;

3° Soluție de CCl_3COOH 5%;

4° Reactiv Folin-Ciocalteu (pag.) diluat 1:2;

5° O soluție de tripsină obținută prin dizolvarea a 50mg enzimă în 100ml soluție apoasă HCl 0,01N sau

6° Gel depus de tripsină imobilizată (2,1ml).

Mod de lucru:

Se amestecă 1ml substrat 1° și 0,2ml soluție tripsină 5% (sau echivalentul a 66mg tripsină imobilizată sub formă de gel depus) (2,1ml), după care se incubă amestecul timp de 10min. la 35,5°C. Se stopează reacția cu 2ml soluție de acid tricloracetic 3°. Se filtrează. Din filtrat se ia 1ml, care se amestecă cu 2ml soluție NaOH 0,5N (2°) și cu 0,6ml reactiv Folin-Ciocalteu diluat (4°).

După un repaus de 10 min. (necesar pentru definitivarea reacției) se citește extincția (densitatea optică) la 660nm față de apă distilată.

Se lucrează și cu o probă martor, în același mod, dar în care soluția de acid tricloracetic se adaugă înaintea soluției de enzimă.

Se interpolează rezultatele pe o curbă etalon.

Observații:a)Trasarea curbei etalon**Materiale necesare:**

- soluție standard de *L* tirozină 1mM (se dizolvă 181,19mg *L* Tyr în 1000ml HCl 0,2N);
- soluție HCl 0,2N;
- NaOH 0,5N;
- reactiv Folin-Ciocalteu.

Mod de lucru:

Se pregătesc cinci diluții diferite de probe standard în HCl 0,2N, ca în tabelul de mai jos:

Tabelul nr.10

| Proba nr. | ml soluția standard | ml HCl 0,2N | n moli Tyr |
|-----------|---------------------|-------------|------------|
| 1 | 0,2 | 4,8 | 40 |
| 2 | 0,4 | 4,6 | 80 |
| 3 | 0,6 | 4,4 | 120 |
| 4 | 0,8 | 4,2 | 160 |
| 5 | 1,0 | 4,0 | 200 |

Din fiecare probă se ia câte 1ml, peste care se adaugă 2ml NaOH 0,5N și 0,6ml reactiv Folin-Ciocalteu diluat 1:2. Se omogenizează prin agitare și se citesc extincțiile la un spectrofotometru, la 660nm față de apa distilată. Se trasează curba-etalon a variației extincției (pe ordonată) în funcție de cantitatea de nmoli Tyr/ml (abscisă).

Față de această curbă se vor citi valorile extincțiilor pentru proba de analizat și pentru proba martor.

b)Calculul rezultatelor

-Pentru tripsină solubilă (liberă), activitatea enzimatică se calculează cu relația:

$$AE(n \text{ moli Tyr/ml soluție enzimă/min/25}^\circ\text{C}) = \frac{nmoli_{\text{probă}} - nmoli_{\text{martor}}}{10} \times 5 \times \frac{1}{3,2}, \text{ unde:}$$

5 =factor de transformare pentru 1ml soluție de enzimă;

1/10 =factor de transformare pentru 1 min. de reacție;

1/3,2 =factor transformare: 1ml filtrat/3,2ml amestec de reacție

-Pentru enzima imobilizată:

$$AE = \frac{nmoli_{\text{probă}} - nmoli_{\text{martor}}}{10 \cdot 2,1} \cdot \frac{1}{5,1}, \text{ în care:}$$

2,1=factor de transformare pentru 1ml gel depus de enzimă imobilizată;

5,1=factor de transformare: 1ml filtrat/5,1ml amestec de reacție.

II.8.4. Determinarea cromatografică a activității tripsinei imobilizate

Acest procedeu este o adaptare a metodei Kunitz. Prezența și procentajul resturilor de aminoacizi dintr-un hidrolizat de cazeină obținut sub acțiunea tripsinei imobilizate se pun în evidență cu ajutorul cromatografiei în strat subțire (CSS).

Materiale necesare:

- soluție de cazeină 2% 2ml;
- gel perlat de tripsină imobilizată 0,5ml;
- amoniac soluție;
- matori: glicină, alanină, valină, leucină, izoleucină, fenilalanină, serină, lizină, treonină, tirozină, prolină, arginină, cisteină, acid aspartic, acid glutamic;
- acetonă;
- metanol;
- acid acetic glacial;
- ninhidrină;
- n*-butanol;
- plăci cromatografice cu silicagel 6, 20x20cm, cu o grosime a stratului adsorbant de aprox. 0,25mm.

Mod de lucru:

Hidroliza

Se iau 2ml soluție apoasă de cazeină 2%, care se hidrolizează în modul descris anterior (pag.65) cu 0,5ml gel depus, perlat, de tripsină imobilizată, la 37°C, timp de 10 min. Se stopează reacția cu 3ml CCl_3COOH 5%, iar amestecul se menține încă 20 min. pe baia de apă la 37°C, după care se filtrează proba, pentru îndepărtarea proteinei nehidrolizate. Se lucrează în continuare cu filtratul obținut, care (dacă este cazul) se poate limpezi cu o picătuță de acid acetic sau de amoniac (soluție).

Reactivul de vizualizare (revelare)

Pentru vizualizare se prepară reactivul cu ninhidrină astfel: la 47,5ml soluție de ninhidrină 2% în acetona proaspăt distilată, se adaugă 2ml apă distilată și 0,5ml acid acetic glacial.

Acest reactiv se prepară cu puțin timp înainte de utilizare.

Cromatografia

Se utilizează un vas (tanc cromatografic) din sticlă, prevăzută cu capac etanș și căptușită cu hârtie de filtru, în care se decupează o fereastră pentru observator.

Pe placa cromatografică se trasează (paralel cu una din laturi) o linie perfect orizontală (linia de start), la 1,5-2cm distanță de margine. Pe această linie se marchează cu creionul o serie de puncte, astfel ca atât distanța dintre două puncte alăturate, cât și dintre punctele extreme și marginile plăcii să fie de maximum 1cm.

Din proba de analizat (hidrolizatul proteic) și soluțiile de martori în metanol sau acetonă se poatează cu o micropipetă sau cu un tub capilar 20-50 μ l pe locurile dinainte atribuite.

Developarea se face cu eluent introdus în tancul cromatografic, într-un strat de 0,5-1cm grosime. Acest eluent se pregătește astfel: un amestec de *n*-butanol-acid acetic-apă (4:1:1v/v/v) se agită într-o pâlnie de separare, reținându-se stratul organic (superior).

După uscarea perfectă în aer a spoturilor de pe placa cromatografică, aceasta se introduce în tanc, în poziție ușor oblică, cu latura corespunzătoare liniei de start în lichid (Atenție! Eluentul nu trebuie să ajungă la sau să depășească linia de start, pentru a nu spăla probele de analizat).

Se acoperă tancul cu capacul și se lasă în repaus, pe o suprafață perfect orizontală.

Când frontul solventului care urcă prin capilaritate ajunge la o distanță de 0,5-1cm de latura superioară a plăcii, aceasta se scoate din tancul cromatografic, se marchează cu creionul frontul și se lasă să se usuce în aer, pe o suprafață curată.

Vizualizarea cromatogramei se face prin pulverizarea uniformă a plăcii cu reactivul cu ninhidrină, urmată de o încălzire ușoară a acesteia într-o etuvă termostată la 100°C, până la apariția nuanțelor de albastru caracteristice α -aminoacizilor din probele luate în analiză.

Evaluarea calitativă a prezenței diverșilor aminoacizi se face prin compararea valorilor R_f ale martorilor cu cele ale aminoacizilor separați din hidrolizatul de cazeină, ca și prin compararea nuanțelor de albastru ale acestora. (R_f =raportul în mm dintre distanța de la linia de start și spotul din cromatogramă și distanța dintre linia de start și frontul solventului).

Evaluarea cantitativă a raporturilor relative dintre diverșii aminoacizi din hidrolizatul proteic se face prin decuparea spoturilor individuale ale aminoacizilor identificați în cromatogramă și eluarea lor, în vase separate, cu câte 3ml metanol. Soluțiile obținute se fotocolorimetreză în cuve de 1cm grosime, față de alcool metilic, citind densitatea optică (D.O.) la $\lambda=509\text{nm}$.

Pentru fiecare aminoacid sau numai pentru unul dintre ei (de exemplu tirozina) se trasează în prealabil o curbă de etalonare a D.O. la 509nm/ μg aminoacid dintr-o soluție standard, pe domeniul de concentrații de 1-100 μg aminoacid p.a., cromatografiată în aceleași condiții ca și proba de cercetat.

Rezultatele se exprimă în μg aminoacid, cu ajutorul lor determinându-se conținutul procentual al aminoacidului respectiv în hidrolizatul de cazeină.

Observație: Dacă nu există plăci cromatografice pregătite (comerciale), acestea se pot obține astfel: pe o placă de sticlă spălată, degresată și uscată, se aplică un strat subțire de 0,25-0,35mm silicagel G, prin întinderea cu ajutorul dispozitivului special a unei suspensii omogene obținută prin amestecarea unei părți (în greutate) de silicagel cu două părți apă distilată. Dacă fluiditatea suspensiei este prea scăzută, se ajustează cu puțină apă.

Placa obținută se lasă în aer, la temperatura camerei, timp de 30 min., după care se activează în etuvă, la 110°C, timp de 60 min.

II.9.Imobilizarea fosfatazei alcaline

Substratele specifice fosfatazei au mase moleculare mici, din care cauză enzima poate fi imobilizată direct pe un suport polihidroxilic activat, fără prezența unui “spacer”, întrucât efectele de împiedicare a difuziei substratului la centrul activ al enzimei sunt reduse.

II.9.1.Imobilizarea fosfatazei alcaline pe alcool polivinilic activat cu BrCN

Materiale necesare:

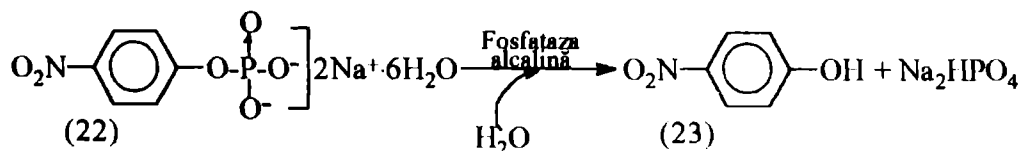
- gel depus de PVA, perlat, reticulat și activat cu BrCN 30ml;
- fosfatază alcalină 100mg;
- soluție NaHCO₃ 0,1N;
- NaCl 0,5M.

Mod de lucru:

30ml gel depus de PVA, perlat, reticulat și proaspăt activat cu BrCN (pag.11) se tratează sub agitare intermitentă cu 100mg fosfatază alcalină dizolvată în 25ml soluție de NaHCO₃ 0,1N, astfel ca pH-ul soluției să fie 8,5-9. Se mai agită ocazional încă 2-3 ore, după care se lasă în repaus, peste noapte, la temperatura camerei (aprox. 12 ore). A doua zi, se filtrează amestecul de reacție la trompă și se spală imobilizatul pe pâlnia Büchner, alternativ, cu apă distilată și soluție de NaCl 0,5M, până la îndepărtarea totală a enzimei neimobilizate (lipsa absorbției de la 280nm în apa de spălare). Până la utilizare, imobilizatul se păstrează în apă distilată, la rece (3-5°C).

II.9.2.Determinarea activității enzimatice a fosfatazei libere și imobilizate

Ca substrat pentru fosfataza alcalină se utilizează fosfatul disodic al *p*-nitrofenolului (22):



p-Nitrofenolul (23) rezultat în urma hidrolizei enzimatice se determină cu ajutorul unui spectrofotometru la 405nm.

Materiale necesare:

- p*-nitrofenil-fenolfosfat 26,30mg;
- tampon glicocol-NaOH 0,2M, pH=10;
- fosfatază alcalină solubilă 5mg sau

-imobilizat de fosfatază alcalină 0,25ml (gel depus);

-NaOH 0,05N.

Mod de lucru:

Se iau două eprubete în care se introduc în ordine:

-câte 2ml soluție 1mM de *p*-nitrofenil-fenolfosfat în tampon glicocol-NaOH 0,2M pH=10 (se prepară dizolvând 26,30mg *p*-nitrofenil-fenolfosfat în 100ml tampon);

-0,5ml soluție de enzimă (5mg fosfatază alcalină dizolvată în 10ml tampon) sau:

-0,5ml suspensie de enzimă imobilizată (se suspendă 0,25ml gel depus de imobilizat în 0,25ml tampon).

Cele două eprubete se incubează 30 min. la 37°C, după care se stopează reacția prin adăugarea a câte 10ml soluție NaOH 0,05N.

Densitatea optică a celor două probe se citește la 405nm și se transformă cu ajutorul unei curbe etalon (alcătuită în prealabil cu *p*-nitrofenol) în μmoli de *p*-nitrofenol eliberat.

Înmulțind rezultatele obținute cu 2, în cazul enzimei libere și cu 4, în cel al enzimei imobilizate, se obține activitatea catalitică per ml probă, la 37°C.

Raportând activitatea enzimatică la cantitatea de fosfatază alcalină luată în probă și la un minut, se obține activitatea specifică a enzimei (în μmoli *p*-nitrofenol eliberat/min/mg enzimă).

Activitatea remanentă a fosfatazei imobilizate se exprimă procentual față de cea a enzimei libere, considerată 100%.

Pentru imobilizatul descris, activitatea remanentă specifică a enzimei este de aprox. 35-40%.

Curba etalon raportată la *p*-nitrofenol

Materiale necesare:

-*p*-nitrofenol;

-tampon glicocol-NaOH 0,2M, pH=10.

Mod de lucru:

Se iau 6 eprubete în care se toarnă câte 1ml soluție tampon glicocol-NaOH 0,2M, pH=10.

În fiecare dintre eprubete se introduc în ordine crescătoare: 1, 3, 5, 7, 9 și 10 mg *p*-nitrofenol. Se agită eprubetele pentru dizolvarea *p*-nitrofenolului. Se incubează eprubetele la 37°C, timp de 30 min.

Se citesc D.O. la 405nm față de apa distilată și se trasează o curbă a variației D.O. în funcție de cantitatea de *p*-nitrofenol în mg/ml.

II.9.3. Determinarea temostabilității fosfatazei alcaline imobilizate

În general, imobilizarea enzimelor conduce la o creștere a stabilității acestora față de factori mecanici sau de: pH, temperatură, atac microbian, acțiunea metalelor grele și a inhibitorilor, la autoproteoliză sau la autodigestie (în cazul enzimelor proteolitice).

Termostabilitatea crescută a fosfatazei alcaline imobilizate este una dintre consecințele acestui proces.

Materiale necesare:

- fosfatază alcalină 5mg;
- tampon glicocol-NaOH 0,2M, pH=10;
- gel depus de fosfatază imobilizată 0,25ml;
- p*-nitrofenolfosfat;
- NaOH 0,05.

Mod de lucru:

Se pregătesc două seturi de eprubete: pentru fosfataza alcalină liberă și imobilizată, fiecare dintre ele constând din câte 5 eprubete (ca în tabelul nr.11).

Tabelul nr.11

Seturi de probe pentru determinarea temostabilității fosfatazei alcaline libere și imobilizate

| Set | Nr. eprubetei | Cant. de fosfatază alcalină liberă (ml) | Cant. de fosfatază alcalină imobilizată (ml gel depus) | Temperatura (°C) |
|-------------------------------------|---------------|---|--|------------------|
| A (cu enzimă liberă) | 1 | 0,5 | -- | 37 |
| | 2 | 0,5 | -- | 45 |
| | 3 | 0,5 | -- | 55 |
| | 4 | 0,5 | -- | 65 |
| | 5 | 0,5 | -- | 80 |
| B (cu enzimă imobilizată) | 1' | -- | 0,5 | 37 |
| | 2' | -- | 0,5 | 45 |
| | 3' | -- | 0,5 | 55 |
| | 4' | -- | 0,5 | 65 |
| | 5' | -- | 0,5 | 80 |

În fiecare set de eprubete se pipetează în ordine:

-0,5ml soluție fosfatază alcalină liberă (obținută prin dizolvarea a 5mg enzimă în 10ml tampon glicocol-NaOH 0,2M, pH=10), pentru set **A** și respectiv

-0,5ml suspensie de fosfatază imobilizată (obținută din 0,25ml gel depus de imobilizat și 0,25ml tampon glicocol-NaOH 0,2M, pH=10), pentru set **B**,

după care se incubează eprubetele timp de 60 min. la 37°, 45°, 55°, 65° și 80°C.

După incubare, se aduce temperatura tuturor probelor la 37°C, apoi în fiecare din ele se adaugă câte 2ml soluție de substrat în tampon (soluția se prepară din 26,3mg *p*-nitrofenolfosfat în 100ml tampon glicocol-NaOH 0,2M, pH=10) și se incubează 30 min. la 37°C.

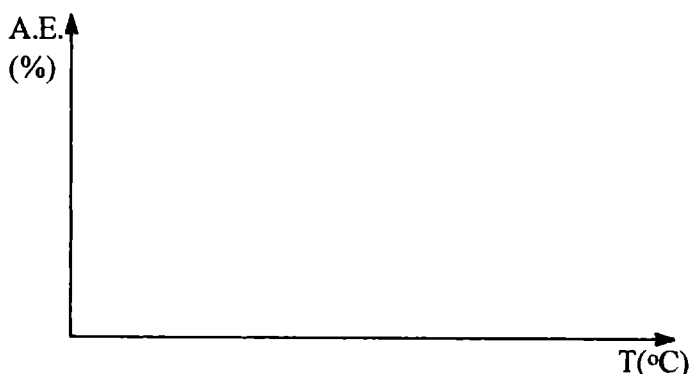
După expirarea acestui timp, se stopează reacția adăugând în fiecare eprubetă câte 10ml NaOH 0,05N și se citesc extincțiile la 405nm, față de apa distilată.

Calculul activității enzimatică se face după cum s-a arătat anterior (pag.72).

Datele obținute, transformate în procente, se trec într-un grafic de forma celui din figura nr. 10.

Figura nr.10

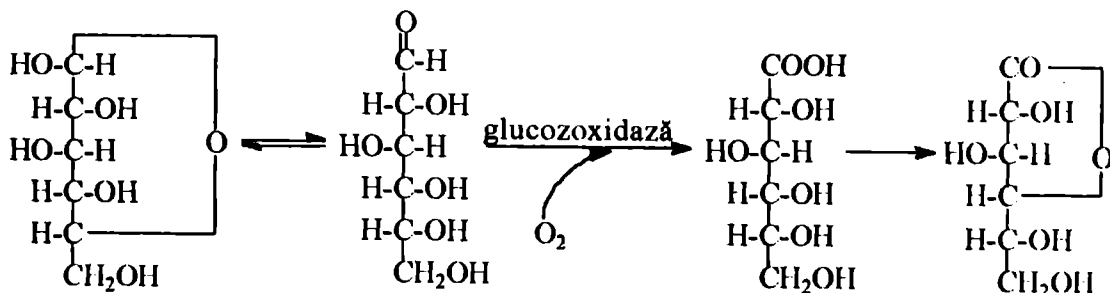
Variația activității fosfatazei alcaline libere și imobilizate cu temperatura



Se observă o creștere a termostabilității fosfatazei după imobilizare, astfel încât chiar la 80°C, activitatea enzimatică remanentă este de aprox. 35%.

II.10.Imobilizarea glucoxidazei

Glucoxidaza catalizează specific oxidarea β -D-glucozei la acid D-gluconolactonă.



Una dintre cele mai frecvente aplicații ale acestei enzime este construcția biosensurilor folosiți pentru dozarea glicemiei din sânge.

Glucoxidaza poate fi imobilizată prin impregnarea unor membrane, în prezența unui agent de reticulare (glutaraldehida).

Imobilizarea prin impregnarea foilor de celofan

Materiale necesare:

- glucozoxidază;
- tampon fosfat 0,02M, pH=6,8;
- foi de celofan;
- glutaraldehydă;
- β -D-glucoză;
- fenazin-metosulfat;
- MTT;
- glicină.

Mod de lucru:

Se prepară o soluție de glucozoxidază de concentrație 6mg/ml (conținând 78 unități de enzimă/mg în tampon fosfat 0,02M, pH=6,8).

3ml din această soluție acoperă 100 cm² dintr-o folie de celofan cu grosimea de aprox. 30μm. După impregnare, folia se usucă în frigider, la +4°C.

Un preparat mai activ se poate obține după două sau trei impregnări și uscări succesive.

După uscare, foile se impregnează prin scufundare într-o soluție de glutaraldehydă 2,5% în același tampon. Reticularea este definitivată prin uscare completă la +4°C. Membranele obținute se spală cu apă distilată, până la dispariția din apa de spălare a absorbției de la 280nm (caracteristică pentru enzimă și glutaraldehydă).

Pentru a testa absorbția enzimei în apa de spălare se utilizează un amestec de glucoză, fenazinmetosulfat și MTT care se colorează în roșu în prezența glucozoxidazei.

Acest reactiv se prepară astfel: 300mg glucoză se amestecă printr-o bună omogenizare cu 20mg MTT și 3mg fenazinmetosulfat. Amestecul obținut ajunge pentru un volum total de 20ml apă de spălare.

Reacția cu apa de spălare se face utilizând câteva picături din aceasta; prezența enzimei determină apariția unei colorații roșii. Spălarea continuă până la dispariția reacției de culoare. În prezența aceluiași reactiv, membrana se colorează rapid și persistent.

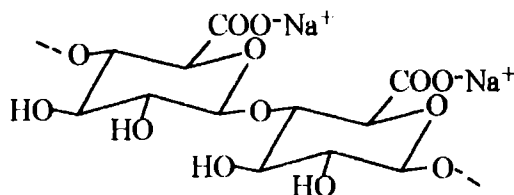
În total, spălarea durează 3-4 ore.

După spălare, membrana se scufundă într-o soluție apoasă de glicină (10mg Gly/ml, pentru blocarea glutaraldehydei libere inclusă în membrana insolubilă fără a fi participat la reticulare.

Membranele obținute pe această cale pot fi păstrate câteva luni la +4°C, fără o scădere notabilă a activității enzimatice a glucozoxidazei.

II.11.Imobilizarea celulelor de *Saccharomyces cerevisiae* prin includere în geluri insolubile

Un suport biocompatibil cu structură de poliuronid este alginatul extras din alge Pheophyta, care se găsește sub formă de sare de sodiu, miscibilă cu apă. Alginatul conține resturi de acid *D*-glucuronic legate β -glicosidic 1,4:

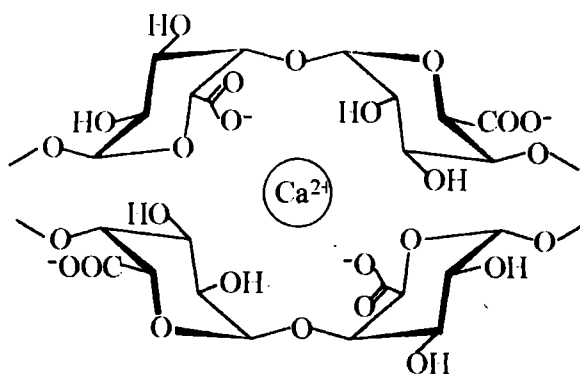


Acest gel este utilizat pe scară largă pentru includerea nu numai a enzimelor și a celulelor moarte, dar și a culturilor de celule, deoarece metoda de imobilizare este blândă și nu afectează viabilitatea celulelor. În plus, suportul este biocompatibil și nu conduce la reacții imunologice. De aceea, imobilizatele în alginat pot fi folosite în bioreactoare pentru obținerea unor produși cu acțiune biologică destinați industriei alimentare, a medicamentelor, a cosmeticelor etc. Principiul general de includere în gelul de alginat este precipitarea ionotropă. Pentru aceasta, gelul apos de alginat se injectează într-o soluție apoasă de CaCl_2 , împreună cu celulele.

Printr-o reacție de schimb ionic, precipită alginatul de calciu insolubil (figura nr.11), cu structură tridimensională, care include în ochiurile rețelei materialul de imobilizat (enzime, celule, extracte celulare brute, organele celulare etc.).

Figura nr.11

Structura gelului insolubil de alginat de calciu



Precipitarea ionotropă a alginatului se poate face și cu ioni de Ba^{2+} și Sr^{2+} .

În alginatul de calciu se poate imobiliza drojdia de brutărie proaspătă sau uscată, obținându-se un agregat pentru fermentația alcoolică a siropurilor de glucoză. Dacă se co-immobilizează drojdia cu β -glucosidază, imobilizatului obținut se poate folosi și la scindarea lactozei din zerul de la fabricarea brânzeturilor.

II.11.1.Imobilizarea celulelor de *Saccharomyces cerevisiae* în alginat de calciu

Materiale necesare:

- alginat de sodiu 1g;
- drojdie de brutărie proaspătă, presată 10g sau
- drojdie de brutărie uscată 4g;
- CaCl₂ 2% 200ml;
- CaCl₂ 0,5%.

Mod de lucru:

1g alginat de sodiu se amestecă până la omogenizare cu 35ml apă distilată. Se adaugă 10g drojdie de brutărie proaspătă, presată, sau 4g drojdie deshidratată. Se omogenizează bine amestecul care se introduce într-o seringă fără ac. Conținutul seringii se picură, sub agitare magnetică, în 200ml soluție de CaCl₂ 2%. (Pentru o includere cantitativă, în seringă nu trebuie să rămână amestec de drojdie și alginat)

După terminarea adăugării, se agită suspensia încă o oră, la temperatura camerei.

Particulele sferice solidificate de imobilizat se separă prin filtrare la trompă și se păstrează la frigider, într-o soluție de CaCl₂ 0,5%.

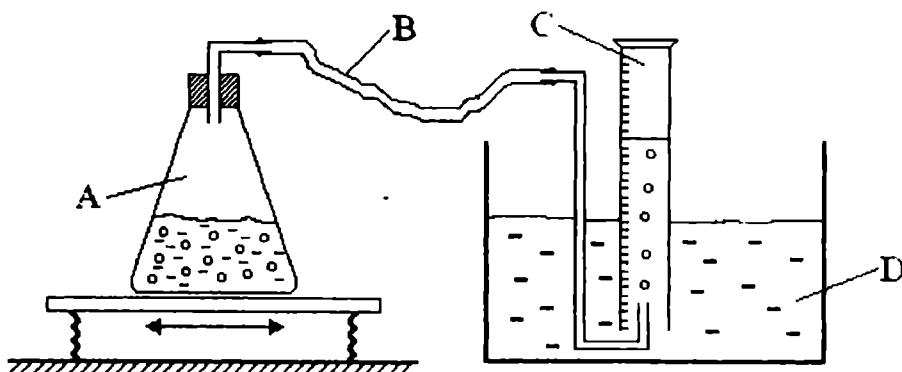
II.11.2.Determinarea activității enzimatice a drojdiei libere și incluse în alginat

Activitatea enzimatică a drojdiei se evaluează măsurând volumul de CO₂ care se degajă la fermentarea glucozei, la 30°C.

Se lucrează într-un dispozitiv alcătuit ca în figura nr.12.

Figura nr.12

Dispozitiv experimental pentru determinarea activității enzimatice a drojdiei de brutărie libere și imobilizate



Instalația este formată din:

-vasul de reacție A, de 200-250ml, prevăzut cu agitare magnetică și un tub B prin care este evacuat CO₂ rezultat în urma fermentației;

-un cilindru gradat de 100ml (C), în care se măsoară volumul de CO₂ format, scufundat în vasul exterior (D), sub nivelul apei din acest vas.

Atenție! La începutul experienței, cilindrul gradat C trebuie să fie umplut complet cu apă.

Ca substrat se folosește o soluție de glucoză 8% în CaCl₂ 0,5%.

Mod de lucru:

În vasul de fermentare A (figura nr.12) se introduc 5g drojdie liberă sau imobilizatul obținut din 5g drojdie proaspătă sau din 4g drojdie uscată, în 50ml soluție de glucoză 8% în CaCl₂ 0,5%. Se termostatează amestecul din vasul A la 30°C (temperatura exterioară). Se începe agitarea magnetică și se notează la fiecare 15 min. volumul de CO₂ care se degajă în cilindrul gradat C.

Rezultatele obținute se trec într-un tabel:

Tabelul nr.12

Volumul de CO₂ rezultat în urma fermentației alcoolice cu Saccharomyces cerevisiae libere și imobilizate

| Timpul (min.) | Volumul CO ₂ degajat cu drojdia proaspătă (ml) | Volumul CO ₂ degajat cu drojdia proaspătă imobilizată (ml) | Volumul CO ₂ degajat cu drojdia uscată imobilizată (ml) |
|---------------|---|---|--|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | | | |
| 30 | | | |
| . | . | . | . |

Observație: Fermentația durează aprox. 4 ore.

II.11.3.Co-imobilizarea drojdiei de brutărie și a β-galactozidazei în gelul de alginat de calciu

În acest caz se obține un preparat care poate fi folosit atât la scindarea lactozei din zer cât și la fermentația alcoolică a D-glucozei rezultate prin scindare.

Se folosește drojdia proaspătă de brutărie și β-galactozidaza reticulată în prealabil cu glutaraldehidă sau coreticulată cu BSA.

a) Reticularea β -galactozidazei

Materiale necesare:

- β -galactozidază 600mg;
- acetonă 30ml;
- glutaraldehydă 25% 2ml;
- azidă de sodiu.

Mod de lucru:

600mg β -galactozidază pură, izolată din *Aspergillus oryzae* se dizolvă în 15ml apă distilată. Soluția obținută se introduce într-un vas prevăzut cu agitator și răcit în exterior pe o baie cu gheață. Se începe agitarea moderată și se adaugă încet 30ml acetonă răcită și apoi, în picături, 2ml soluție apoasă de glutaraldehydă 25%. Amestecul obținut se mai agită încă 60 min. la 30°C, după care se îndepărtează supernatantul prin centrifugare și decantare.

Reticulatul se spală cu câte 40ml apă distilată prin câteva centrifugări și decantări repetate, după care se suspendă în 100ml apă distilată cu puțină azidă de sodiu (pentru evitarea atacului microbial).

Activitatea enzimatică reziduală a β -galactozidazei reticulate astfel este de 35,6%.

O activitate remanentă superioară (până la aprox.41%) se poate obține coreticulând β -galactozidaza cu BSA și glutaraldehydă (metoda b).

b) Coreticularea β -galactozidazei cu BSA și glutaraldehydă

Materiale necesare și modul de lucru:

Sunt aceleași ca și în cazul a), cu deosebirea că la soluția obținută prin dizolvarea a 600mg β -galactozidază în 15ml apă distilată, se adaugă 150mg BSA.

c) Co-imobilizarea β -galactozidazei reticulate și a drojdiei de brutărie

Se preferă coreticulatul β -galactozidazei cu BSA, care are o activitate enzimatică remanentă mai mare.

Materiale necesare:

- coreticulatul obținut la punctul b);
- alginat de sodiu 1g;
- drojdie proaspătă 10g;
- soluții de CaCl_2 2% și 0,5%.

Mod de lucru:

Reticulatul de la punctul b) se filtrează la presiune redusă și se spală bine pe filtru, cu apă distilată, pentru îndepărtarea azidei de sodiu.

Gelul spălat și filtrat se amestecă cu 1g alginat, 10g drojdie de brutărie proaspătă și 35ml apă distilată, până la omogenizarea perfectă.

Amestecul obținut se introduce într-o serigă fără ac și se picură în 200ml soluție CaCl₂ 2%, sub agitare. Pentru solidificarea particulelor de imobilizat, amestecul se mai agită o oră la temperatura camerei. Imobilizatul obținut se separă prin decantare și se suspendă într-o soluție de CaCl₂ 0,5%.

Se păstrează la frigider.

Observație: Determinarea activității enzimatică a co-imobilizatului de drojdie și β -galactozidază se face după metoda descrisă anterior (pag.77), față de glucoză ca substrat.

II.12.Imobilizarea celulelor de Streptomyces simplex pe colagen

Colagenul oferă numeroase avantaje în calitate de suport pentru imobilizarea enzimelor și celulelor microbiene. Acest suport, ușor accesibil, biocompatibil și netoxic poate fi izolat din diferite surse biologice și condiționat sub diverse forme (filme, membrane, filamente etc.), fără a-și pierde structura nativă. În structura sa de triplu helix ordonat sub formă de fibrile, colagenul conține un număr mare de centri disponibili pentru cuplarea enzimelor, resturile de aminoacizi din catena polipeptidică interacționând cu enzimele prin intermediul grupelor libere polare și nepolare. Datorită moleculelor de hidroxiprolină reținute prin legături de hidrogen pe catena polipeptidică, colagenul are o capacitate ridicată de îmbibare cu apă, factor favorizant pentru includerea moleculelor de enzime și a celulelor.

Imobilizarea pe colagen a biocatalizatorilor este simplă, are loc în condiții blânde (în mediu apos, la temperatura camerei), reducându-se la minim posibilitatea inactivării enzimelor și a celulelor, chiar a celor viabile.

În funcție de scopul urmărit, colagenul poate fi modificat și chimic; astfel, el se poate reticula cu agenți bifuncționali pentru o imobilizare mai puternică a biocatalizatorilor, sau se pot modifica sarcinile electrice de pe suprafața sa, pentru a favoriza legarea biocatalizatorilor prin intermediul grupelor -COOH sau -NH₂ ale acestora.

Practic, se cunosc trei metode de obținere a membranelor de colagen cu biocatalizatori imobilizați:

- a)metoda impregnării membranelor preformate;
- b)metoda complexării macromoleculare;
- c)metoda electrodepunerii.

În cazul celulelor se folosește în special tehnica b) (a complexării macromoleculare); pentru o imobilizare optimă, raportul (în greutate) colagen/celule deshidratate este de 1/5.

Pentru o reținere mai bună a celulelor uscate se recurge suplimentar la reticulare.

Datele de literatură semnalează faptul că în cazul corecturii biocatalizatorilor cu glutaraldehidă în prezența unei proteine inerte (BSA), se formează un aduct cu rețele tridimensionale mai dense, datorită creșterii numărului de grupe participante la reacția cu agentul de reticulare. În cazul colagenului nu este obligatorie prezența proteinelor inerte.

II.12.1. Imobilizarea celulelor de *Streptomyces* sp prin corecturare cu colagen

Materiale necesare:

- celule uscate de *Streptomyces* sp 2g;
- colagen 10g;
- NaOH 0,1N;
- glutaraldehidă 2g.

Mod de lucru:

Se omogenizează un amestec de 2g celule uscate de *Streptomyces* sp cu 10g colagen, ajustându-se pH-ul amestecului la 7,5-8,0, cu NaOH 0,1N.

Amestecul omogen astfel format se introduce într-o seringă și se extrudează în 40ml soluție apoasă de glutaraldehidă 5% (conține 2g de aldehidă). Acul seringii se alege în funcție de diametrul filamentelor de aduct ce urmează a fi obținute.

Se lasă amestecul de reacție în repaus, o oră, la temperatura camerei, pentru definitivarea reticulării. După scurgerea acestui timp se izolează preparatul enzimatic prin decantare și se spală de câteva ori cu apă distilată pentru îndepărtarea glutaraldehidei nereacționate (reacție Fehling sau Schiff negativă în apa de spălare).

Imobilizatul separat prin decantare se usucă într-o etuvă, la 50-60°C.

III.UTILIZĂRI ALE UNOR BIOCATALIZATORI LIBERI ȘI IMOBILIZAȚI

Enzimele ca și alți biocatalizatori (celule, extracte celulare, organite celulare etc.) se utilizează pe scară largă, în special pentru sinteza și/sau studiul unor substanțe bioactive (vitamine, hormoni, proteine, medicamente, produse cosmetice și alimentare, seruri și vaccinuri, imunosupresive etc.), ca și la construirea unor biosensori pentru dozări “in vivo” și “in vitro”. De asemenea, biocatalizatorii imobilizați servesc la cercetări diverse în laboratoarele de biochimie, chimie sau biochimie clinică.

În concurența până la un anumit nivel cu industria chimică de sinteză bazată în special pe materii prime și intermediari de proveniență petrochimică, biotehnologiile cuceresc din ce în ce mai mult teren, procedeele de biosinteză fiind mai puțin energofage și mult mai economice (parametri accesibili, înlăturarea gigantismului instalațiilor, coroziune minimă, continuitatea proceselor tehnologice, puritatea înaltă a produșilor de reacție, poluare redusă etc.).

Acești factori determină o diversificare permanentă a bioindustriilor care folosesc biocatalizatori imobilizați. În comparație cu industria produselor farmaceutice, industria alimentară a cunoscut o dezvoltare superioară, multe procedee fermentative devenind procese de rutină în domeniul industrializării laptelui și a cărnii, al produselor zaharoase, al băuturilor alcoolice etc.

Mai pretențioasă, industria medicamentelor de semisinteză implică deseori reacții într-o singură etapă sau într-un număr mic de secvențe, care spre deosebire de fermentații sau alte cicluri metabolice complete necesită fie enzime de înaltă puritate, fie co-immobilizate de enzime multisevențiale sau de enzime și cofactori, cu costuri de producție ridicate.

În cele ce urmează vom da câteva exemple de utilizare a biocatalizatorilor în sinteze și determinări de laborator ale unor substanțe bioactive.

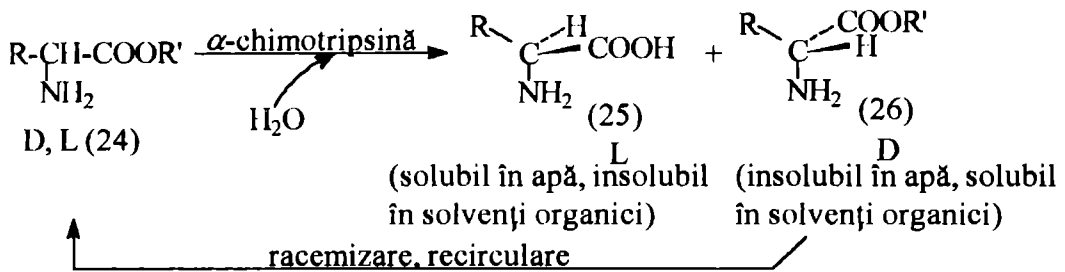
III.1.Scindări de amestecuri racemice

În sinteza chimică a unor substanțe cu molecule chirale, condițiile din laborator fiind achirale, se obțin totdeauna amestecuri racemice și nu enantiomeri optic puri, racemizarea acestora (favorizată termodinamic) producându-se spontan. Cum numai unul dintre enantiomerii unui racemic prezintă proprietăți bioactive, este necesară scindarea racemicului cu obținerea acestuia.

Enzimele cu enantiospecificitate sunt utilizate pe scară largă pentru scindarea racemicilor, din care se obțin produși bioactivi pentru medicină, industria alimentară, cosmetică, industria farmaceutică.

III.1.1.Scindarea enantiospecifică a *D,L*-triptofanului

O metodă de scindare a racemicilor *D,L*- α -aminoacizilor aromatici sau heteroaromatici utilizează capacitatea esterazică a α -chimotripsinei. Pentru aceasta, aminoacidul racemic este transformat mai întâi în ester inferior (metilic sau etilic), acesta fiind supus apoi hidrolizei enantiospecifice în prezența α -chimotripsinei, cu obținerea *L*-aminoacidului optic pur (25):

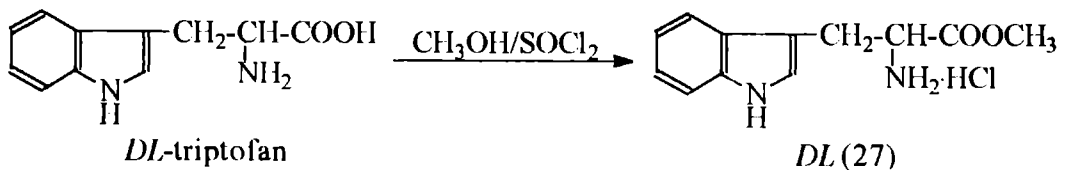


Prođușii de reacție se separă pe baza diferenței de solubilitate.

Metoda are totuși o aplicabilitate restrânsă doar la câțiva α -aminoacizi, deoarece în prezența chimotripsinei esterii α -aminoacizilor se pot polimeriza; în plus, enantiomerii *D* ai esterilor rezultați din reacție sunt de obicei inhibitori ai enzimei.

Excepție fac substrat ca: esterul metilic al *D,L*-triptofanului, esterii *DL*-fenilalaninei, esterul etilic al *D,L*-tirozinei.

a)Obținerea clorhidratului esterului metilic al *D,L*-triptofanului (27)



Materiale necesare:

- D,L*-triptofan 20,4g (0,1 moli);
- CH₃OH absolut 30ml;
- SOCl₂ 11,9g (0,1 moli) – 7,9ml.

Mod de lucru:

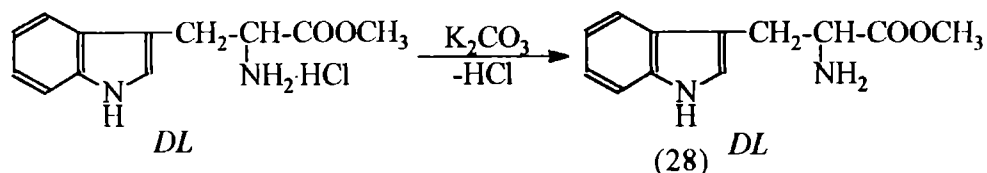
20,4g *D,L*-triptofan se suspendă prin agitare în 30ml metanol absolut. Se răcește suspensia sub agitare la 0°C, pe o baie cu amestec răcitor.

La suspensia formată se adaugă treptat, sub răcire și agitare, 7,9ml SOCl₂, timp de 20 min. (Atenție! Se va lucra într-o nișă cu tiraj bun.).

După terminarea adăugării, se scoate vasul din amestecul răcitor și se lasă reacția să se definitiveze la temperatura camerei, până la omogenizarea amestecului (aprox. 50-60 min.).

Se evaporă metanolul pe baie de apă. Reziduu se răcește puternic și se agită pentru inițierea cristalizării. Rezultă clorhidratul esterului metilic al *D,L*-triptofanului, cu p.t.=216°C (27).

b) Descompunerea clorhidratului esterului



Materialie necesare:

- clorhidratul esterului (de la punctul a);
- K_2CO_3 sau Na_2CO_3 30% în apă distilată;
- KOH anhidru.

Mod de lucru:

Clorhidratul metil-esterului *D,L*-triptofanului se amestecă cu 20g gheață pisată, după care se aduce la pH=7,5 cu o soluție de K_2CO_3 sau Na_2CO_3 30%, adăugată în picături, sub agitare continuă și răcire exterioară pe o baie cu amestec răcitor (apă și gheață).

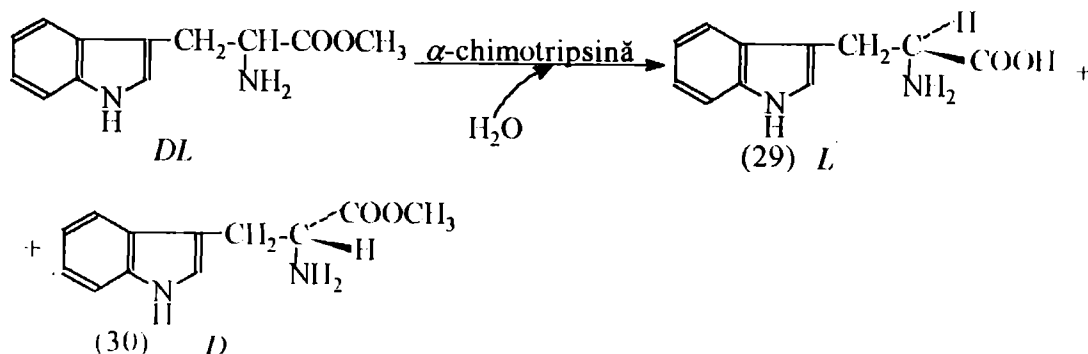
După neutralizare și topirea gheții din baia de răcire, esterul metilic al *D,L*-triptofanului (28) se extrage de 3 ori cu câte 20ml eter etilic. Extractele eterice reunite se spală cu 25ml apă distilată, după care se usucă timp de o oră pe KOH anhidru.

Se evaporă eterul etilic pe o baie de apă, la 40°C. Reziduu uleios, slab-gălbui, cristalizează după un repaus de câteva zile în frigider. Se recrystalizează (la nevoie) din eter etilic-eter de petrol (1:1 v/v).

P.t.=71-73°C.

Observație: Pentru scindare în antipozii, se poate utiliza și metilesterul uleios.

c) Scindarea enantiospecifică a esterului metilic al *D,L*-triptofanului



Materiale și aparatură necesare:

- pH-metru cu electrod mixt standardizat cu un tampon la pH=7;
- biuretă de titrare cu aprox. 10ml NaOH 1N;
- α -chimotripsină imobilizată prin reticulare (pag.53);
- metil ester al *D,L*-triptofanului (28) 4,04g (20 mmoli);
- HCl conc.;
- Na₂SO₄ anhidru;
- metanol;
- etanol.

Mod de lucru:

Într-un pahar Berzelius de 250ml prevăzut cu agitare magnetică, se introduce un amestec de 4,04g (20 mmoli) ester metilic al *D,L*-triptofanului și 15ml metanol. Se începe agitarea și se adaugă rapid 100ml apă distilată. Se aranjează electrodul mixt în masa de reacție, deasupra căreia se suspendă biureta cu NaOH 1N.

La soluția metanolică agitată se adaugă o soluție formată din 15mg α -chimotripsină în 2ml apă, sub agitare. Se spală rapid eprubeta în care a fost soluția de enzimă cu încă 2ml apă distilată, care se adaugă de asemenea la amestecul de reacție.

În cazul utilizării α -chimotripsinei imobilizate, se adaugă în amestecul de reacție imobilizatul filtrat în prealabil, obținut prin reticularea a 20mg α -chimotripsină.

Se controlează pH-ul soluției în permanență, menținându-l la valoarea 7 (pH-ul optim al α -chimotripsinei), prin titrare cu mici cantități de NaOH 1N (Atenție! Adăugarea unei cantități prea mari de NaOH poate duce la denaturarea chimotripsinei la pH>8,5, în prezența metanolului).

După 2 ore se stopează reacția prin ajustarea rapidă a pH-ului la 12 și apoi, cu HCl conc., se aduce la pH=6. Se evită prelungirea timpului de reacție, care duce la scăderea enantiospecificității enzimei [(se poate hidroliza și esterul metilic al *D*-triptofanului (30)].

Amestecul de reacție se evaporă la un volum de 20ml (la trompă, pe baie de apă sau într-un curent de aer cald).

Reziduul se păstrează peste noapte la 0°C, după care se filtrează la presiune redusă esterul metilic al *D*-triptofanului (30).

Atenție! Se păstrează filtratul apos, care conține *L*-triptofan (29).

Cristalele de ester al *D*-triptofanului se spală pe pâlnia Büchner cu puțină apă rece. Filtratul apos se reunește cu primul filtrat. Esterul metilic al *D*-triptofanului se usucă în aer.

Fazele apoase reunite, rămase după separarea esterului metilic al *D*-triptofanului se acidulează cu HCl conc., la pH=1; se răcește pe o baie cu gheață.

L-Triptofanul cristalizat (la nevoie, după evaporarea la jumătate din volum a fazei apoase acidulate) se separă prin filtrare la trompă, se spală cu puțină apă rece și se usucă la aer.

Se recristalizează dintr-un amestec apă-etanol 1/1 (v/v).

$$[\alpha]_D^{20} = +5,2 \pm 0,5^\circ \text{ (2\% în HCl 1N)}$$

Observații:

1) Experiența poate fi considerată terminată după etapa descrisă mai sus.

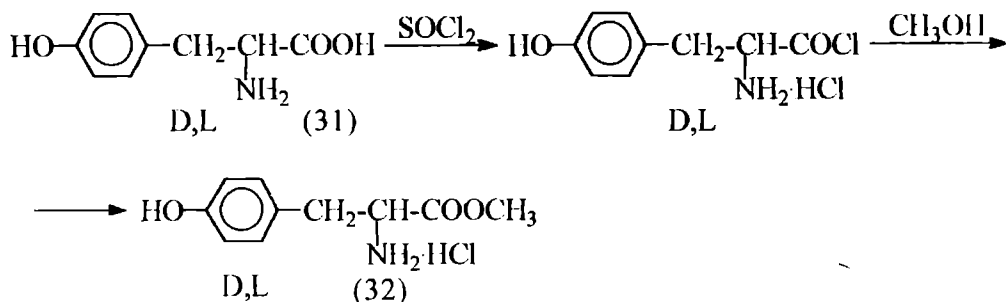
2) Se poate obține și *D*-triptofanul refluxând esterul metilic al acestuia cu HCl 20%, timp de 5 ore.

3) Pentru *D*-Trp: $[\alpha]_D^{20} = -5 \pm 1^\circ$ (2% în HCl 1N)

III.1.2.Scindarea *DL*-tirozinei

Principiul metodei, etapele și modul de lucru sunt asemănătoare cu cele descrise pentru *D,L*-triptofan.

a) Obținerea clorhidratului esterului metilic al *D,L*-tirozinei (32)



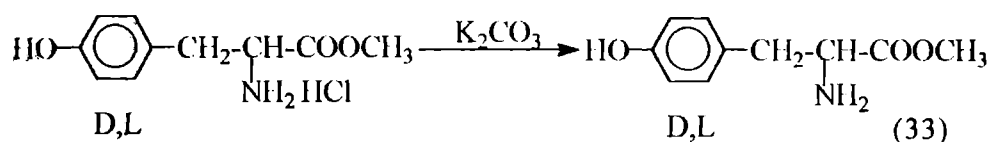
Materiale necesare:

- D,L*-tirozină 18,1g (0,1 moli);
- CH₃OH abs. 30ml;
- SOCl₂ 11,9g (0,1 moli); 7,9ml.

Mod de lucru:

18,1g *DL*-Tyr se suspendă prin agitare în 30ml metanol absolut. Se răcește suspensia la 0°C cu ajutorul unei băi cu amestec răcoror.

Se adaugă, sub agitare, în picături, timp de 20 min., 7,9ml SOCl₂ (Atenție! Se va lucra într-o nișă cu tiraj bun.). După terminarea adăugării SOCl₂, amestecul de reacție se scoate din baia de răcire și se agită la temperatura camerei până la transformarea masei cristaline într-un ulei dens. Metanolul se evaporă pe o baie de apă, iar reziduu se răcește puternic sub agitare, pentru a cristaliza. Pentru o cristalizare completă se lasă peste noapte în frigider, la 0°C.

b) Descompunerea clorhidratului esterului metilic al *D,L*-tirozinei**Materiale necesare:**

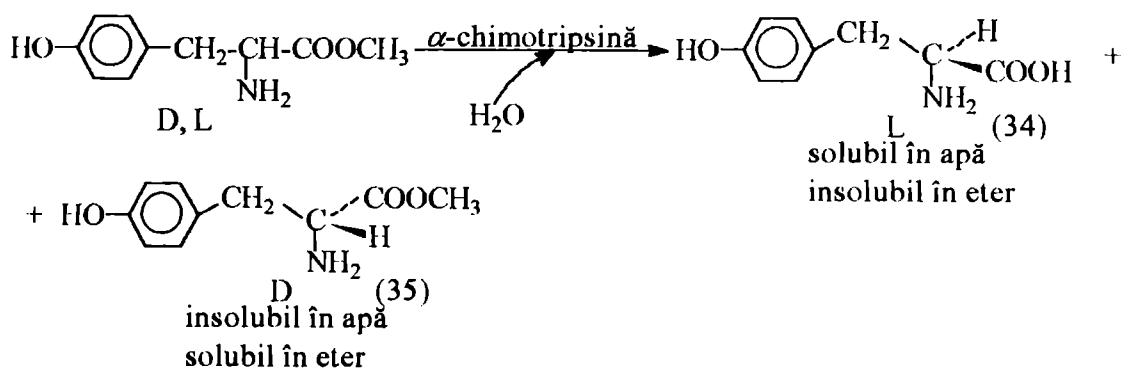
- clorhidrat al *D,L*-tirozinatului de metil 23,15g (0,1moli);
- K_2CO_3 27g (0,2 moli);
- eter etilic.

Mod de lucru:

23,15g clorhidrat al *D,L*-tirozinatului de metil se tratează cu 27g K_2CO_3 sub formă de soluție apoasă 30%, răcită în prealabil și adăugată treptat, sub agitare; amestecul de reacție se menține la $-2-0^\circ\text{C}$, prin răcire exterioară.

Soluția apoasă formată se extrage de 4 ori cu câte 50ml eter etilic. Extractele eterice reunite se spală de câteva ori cu apă distilată și se usucă o oră pe KOH. Se distilă eterul pe baie de apă.

Reziduul uleios cristalizează prin agitare și răcire. În caz de nevoie, se lasă peste noapte în repaus, la 0°C , în frigider.

c) Hidroliza enantiospecifică a esterului metilic al *D,L*-tirozinei

Se utilizează α -chimotripsină solubilă sau imobilizată prin reticulare.

Materiale și aparatură necesară:

- pH-metru cu electrod mixt, standardizat cu un tampon la pH=7;
- biuretă de titrare cu NaOH 1N;
- ester metilic al *DL* Tyr 3,9g (20 mmoli);
- metanol 15ml;
- NaOH 1N;
- α -chimotripsină solubilă 15mg sau echivalentul în α -chimotripsină reticulată (reticulat obținut din 20mg enzimă);

-HCl conc.;

-CH₂Cl₂.

Mod de lucru:

Într-un pahar Berzelius de 250ml prevăzut cu agitare magnetică, se introduce o soluție formată din 3,9g ester metilic al *D,L* Tyr în 15ml metanol.

Se începe agitarea și se adaugă rapid 100ml apă distilată. Se aranjează electrodul mixt în masa de reacție, deasupra căreia se suspendă o biuretă cu soluție apoasă de NaOH 1N, pentru ajustarea pH-ului. La soluția agitată se adaugă 15mg α -chymotripsină dizolvată în 2ml apă distilată (eprobeta în care a fost soluția de enzimă se spală rapid cu 2ml apă distilată care se adaugă de asemenea la amestecul de reacție).

Pentru varianta cu enzimă imobilizată, se adaugă reticulatul depus obținut din 20mg α -chymotripsină.

Se controlează pH-ul masei de reacție în permanență, menținându-l la valoarea 7, prin titrare cu NaOH 1N (Atenție! Nu se va adăuga dintr-o dată o cantitate mare de NaOH, deoarece la pH>8,5 enzima se denaturează).

După 2 ore se stopează reacția prin ajustarea pH-ului la 12, după care se aduce la pH=6 cu HCl conc.

Amestecul de reacție se evaporă la un volum de aprox. 20ml (la trompă, pe baie de apă sau în curent de aer cald). Reziduu obținut se păstrează peste noapte în frigider la 0°C, după care se filtrează la presiune redusă, cristalele de ester metilic al *D* Tyr (35).

Atenție! Se păstrează filtratul apos, care conține *L*-Tyr (34).

Cristalele de ester metilic al *D* Tyr se spală pe pâlnia Büchner cu puțină apă rece, filtratul apos reunindu-se cu primul. Esterul metilic al *D* Tyr se usucă în aer, după care se recrystalizează din heptan-acetat de etil 1:1 (v/v).

Filtratele apoase reunite se extrag de două ori cu câte 15ml eter etilic. Din extractele eterice reunite se mai obține după evaporare o cantitate mică de ester metilic al *D*-Tyr.

Faza apoasă rămasă după separarea esterului metilic al *D*-Tyr se acidulează cu HCl conc. la pH=1 și se răcește puternic pe o baie de gheață.

În caz că *L*-Tyr nu cristalizează, se evaporă soluția apoasă la 1/3 din volumul inițial și se răcește puternic.

L-Tirozina cristalizată se filtrează la presiune redusă, se spală cu puțină apă rece și se usucă în aer. Se poate recrystaliza dintr-o cantitate minimă de apă distilată.

$$[\alpha]_D^{20} = -10,3 \pm 1'' \text{ (2\% în HCl 5N).}$$

Observație: Experiența poate fi considerată încheiată după obținerea *L*-Tyr și a esterului metilic al *D*-Tyr.

Esterul *D*-Tyr se poate supune saponificării prin fierbere cu HCl 20%, timp de 5 ore. Pentru *D*-Tyr: $[\alpha]_D^{20} = +10 \pm 0,5'' \text{ (2\% în HCl 5N).}$

III.1.3.Scindarea *D,L*-fenilalaninei

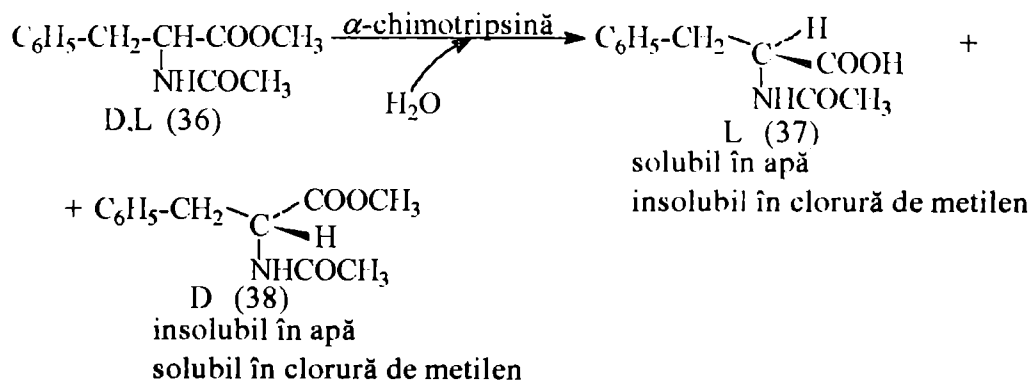
Esterii *D,L*-fenilalaninei nu pot fi scindați direct prin saponificare enantiospecifică în mediu apos cu chimotripsina din pancreasul de porc, deoarece în aceste condiții esterii *D,L*-Phe rezultați ca produși secundari sunt inhibitori puternici ai enzimei.

De aceea, α -chimotripsina este utilizată în fază apoasă, doar pentru hidroliza enantiospecifică a esterilor *N*-acilați ai *D,L*-Phe.

În schimb, într-un sistem bifazic apă-solvent organic nemiscibil cu apa există posibilitatea obținerii cu randament înalt a *L*-Phe din esterul metilic al *D,L*-Phe, deoarece esterul *D*-Phe rezultat din reacție trece în faza organică, evitându-se astfel contactul cu enzima și deci inhibarea acesteia.

În cele ce urmează va fi descrisă scindarea *D,L*-Phe în mediu apos.

Se folosește ca substrat esterul metilic al *N*-acetil- *D,L*-fenilalaninei (36). Ecuația de bilanț pentru scindarea enzimatică a acestui racemic este următoarea:



1°Sinteza esterului metilic al *N*-acetil-*D,L*-fenilalaninei (36)

Metoda A

Această metodă constă în *N*-acetilarea *D,L*-Phe și esterificarea ulterioară a *D,L*-Phe *N*-acetilate.

a)Acetilarea *D,L*-fenilalaninei

Materiale necesare:

- *D,L*-Phe 5g;
- NaOH 1N;
- anhidridă acetică 3,1g (30,2 mmoli) – 1,72ml;
- HCl conc.

Mod de lucru:

Într-un flacon Erlenmeyer de 100ml se dizolvă 5g *D,L*-Phe în 61ml NaOH 1N.

Se adaugă rapid 1,72ml anhidridă acetică, se astupă flaconul cu un dop și se agită viguros timp de 10 min. la temperatura camerei.

Rezultă un amestec limpede, care se acidulează cu HCl conc. (în prezență de roșu de Congo), se răcește într-o baie de gheață și se filtrează cristalele de *N*-acetil-*D,L*-fenilalanină pe o pâlnie Büchner, la presiune redusă. Se spală cu puțină apă răcită pe gheață. Dacă este necesar, se recristalizează dintr-un volum minim de apă distilată.

P.t.=151-153°C.

b) Esterificarea *N*-acetil-*D,L*-fenilalaninei [obținerea compusului (36)]

Materialle necesare:

- N*-acetil *D,L*-Phe 4g (19mmoli);
- metanol absolut 30ml;
- SOCl₂ 2,26g (19mmoli) – aprox. 1,4ml;
- dicloretan 35ml;
- Na₂CO₃ 5%;
- NaCl;
- Na₂SO₄ (MgSO₄) anh.;
- eter de petrol sau hexan;
- heptan;
- acetat de etil.

Mod de lucru:

Într-un flacon Erlenmeyer cu dop rodat se dizolvă 4g *N*-acetil *D,L*-Phe în 30ml metanol absolut și se adaugă o cantitate echimoleculară (1,4ml) SOCl₂. Se astupă flaconul și se lasă să stea câteva ore la temperatura camerei, sub agitare ocazională.

După scurgerea timpului de reacție se evaporă metanolul pe baie de apă, iar reziduul se dizolvă în 35ml dicloretan. Soluția organică se spală alternativ cu Na₂CO₃ 5% și soluție salină (NaCl 20-25%), până ce soluția salină de spălare prezintă reacție neutră (pe indicator universal de pH). Faza organică se separă, se usucă timp de câteva ore pe MgSO₄ anh. sau Na₂SO₄ anh., se filtrează, și se evaporă la sec, pe baie de apă.

Reziduul, la început sub forma unui ulei, cristalizează prin agitare și răcire energetică pe un amestec răcitor (gheață și NaCl). În caz că nu se produce cristalizarea, se adaugă puțin hexan sau eter de petrol și se agită viguros cu o baghetă, menținându-se pe amestecul răcitor.

Cristalele obținute, de ester metilic al *N*-acetil *D,L*-Phe, se separă prin filtrare la presiune redusă și se pot recristaliza într-un amestec de heptan-acetat de etil (1:1 v/v).

P.t.=64,5-66°C.

Metoda B

Acest procedeu inversează etapele de obținere a substratului (36), comparativ cu metoda A.

a) Esterificarea *D,L*-fenilalaninei

Materiale necesare:

- D,L*-Phe 5g (30,2 mmoli);
- metanol anhidru 30ml;
- SOCl₂ 3,6g (30,2 mmoli) – 2,2ml;
- eter etilic.

Mod de lucru:

Într-un flacon Erlenmeyer de 50ml se introduc 5g *D,L*-Phe, peste care se adaugă 30ml metanol anhidru.

Se răcește amestecul, sub agitare, într-o baie de răcire, până la 0°C. La suspensia astfel formată se adaugă, sub agitare, un echivalent molar de SOCl₂ (2,2ml), menținând temperatura amestecului de reacție în jur de 0°C. După terminarea adăugării, se scoate vasul din baia de răcire și se lasă să se definitiveze reacția la temperatura camerei, cu agitare ocazională.

Reacția este completă atunci când amestecul devine omogen. Se evaporă metanolul pe baie de apă, se răcește reziduul uleios, la care se adaugă puțin eter etilic. Se agită puternic sub răcire energetică, pentru inițierea cristalizării.

Produsul de reacție cristalin se separă prin filtrare la trompă. Rezultă clorhidratul esterului metilic al *D,L*-Phe, cu p.t.=157,5-158,5°C (randament \cong 85%).

b) Acetilarea esterului metilic al *D,L*-fenilalaninei [obținerea substratului (36)]

Materiale necesare:

- clorhidrat al esterului metilic al *D,L*-Phe;
- benzen;
- trietilamină;
- clorură de acetil;
- heptan;
- acetat de etil;
- eter de petrol.

Mod de lucru:

Într-un vas Erlenmeyer se introduce clorhidratul esterului metilic al *D,L*-Phe obținut la punctul a), peste care se adaugă 25-30ml benzen și un echivalent molar de trietilamină. Suspensia formată se agită timp de 15 min. Se răcește amestecul la 0°C, se mai adaugă încă un echivalent de trietilamină și apoi 1,1 echivalenți molar de clorură de acetil.

După adăugare, se lasă amestecul să revină la temperatura camerei, apoi se filtrează la presiune redusă pentru îndepărtarea clorhidratului solid al trietilaminei. Filtratul se evaporă la sec. pe baia de apă.

Se obține un produs uleios, care cristalizează prin răcire puternică (și, eventual, prin adăugare de puțin eter de petrol). Se filtrează esterul metilic al *N*-acetil-*D,L*-Phe, la presiune redusă. Se poate recristaliza din heptan-acetat de etil (1:1 v/v).

P.t.=64,5-66°C.

2° Hidroliza enzimatică enantiospecifică a esterului metilic al *N*-acetil *D,L*-fenilalaninei (36)

Material și aparatură necesare:

- pH-metru cu electrod mixt, standardizat cu un tampon cu pH=7;
- biuretă pentru titrare, cu NaOH 1N;
- ester metilic al *N*-acetil *D,L*-Phe 4,42g (20 mmoli);
- metanol 15ml;
- α -chimotripsină 15mg sau echivalentul în α -chimotripsină imobilizată (obținut prin reticularea a 20mg chimotripsină);
- NaOH 1N;
- HCl conc.;
- heptan;
- acetat de etil;
- clorură de metilen;
- Na₂SO₄ anh.

Mod de lucru:

Într-un pahar Berzelius de 250ml, prevăzut cu agitator magnetic, se introduce o soluție formată din 4,42g ester metilic al *N*-acetil *D,L*-Phe în 15ml metanol. Se începe agitarea și se adaugă rapid 100ml apă distilată. Se aranjează electrodul mixt în masa de reacție deasupra căreia se suspendă biureta cu NaOH 1N, pentru o titrare de pH. La soluția metanolică agitată se adaugă o soluție obținută din 15mg α -chimotripsină în 2ml apă. Se spală rapid eprubeta în care a fost soluția de enzimă cu 2ml apă distilată, care se adaugă de asemenea la amestecul de reacție. Dacă se lucrează cu enzima imobilizată, se folosește aductul obținut prin reticularea a 20mg α -chimotripsină (pag.53), imobilizatului (filtrat în prealabil), adăugându-se sub agitare la soluția substratului. Se controlează în permanență pH-ul amestecului de reacție, menținându-se la valoarea 7, prin ajustare cu mici cantități de NaOH 1N.

Durata reacției este de două ore, în urma sa rezultând un amestec din produșii (37) și (38). După terminarea reacției, se aduce pH-ul la 12 cu NaOH 1N și apoi se ajustează la 6 cu HCl conc., adăugat în picături.

Amestecul de reacție rezultat se evaporă la un volum final de 15-20ml (la trompă, pe baie de apă sau în curent de aer cald).

Reziduul se lasă peste noapte la 0°C, după care se filtrează cristalele de ester metilic al *N*-acetil-*D*-Phe (38), care se spală pe pâlnia Büchner cu puțină apă. Esterul metilic al *N*-acetil-*D*-Phe (38) se usucă în aer. P.t.=73-75°C.

Se recrystalizează din heptan-acetat de etil (1:1 v/v), ridicându-se punctul de topire la 88-89°C. $[\alpha]_D^{25} = -16^\circ$ (4% în etanol). După a doua recrystalizarea se îmbunătățesc atât p.t. (90-91°C) cât și $[\alpha]_D^{25} = -18,5^\circ$.

Filtratele apoase reunite, care conțin *N*-acetil-*L*-Phe (37) se extrag de două ori cu câte 15ml CH₂Cl₂. Extractele organice reunite se spală cu puțină apă (nu se aruncă fazele apoase!) și se usucă pe Na₂SO₄ anh. După evaporarea pe baie de apă la sec a fazei organice, se mai separă o mică cantitate de compus (38) (ester metilic al *N*-acetil-*D*-Phe).

Fazele apoase rezultate de la filtrarea, extracția și spălarea compusului (38) se reunesc și se acidulează cu HCl conc. la pH=1. Se răcește puternic pe o baie de gheață, când precipită compusul (37) (*N*-acetil-*L*-Phe). Dacă nu are loc cristalizarea, se concentrează faza apoasă acidulată la 1/2-1/3 din volum și se răcește puternic.

Se filtrează precipitatul de *N*-acetil-*L*-Phe, se spală pe pâlnia Büchner cu puțină apă răcită cu gheață și se usucă în aer. P.T.=170-172°C.

După o primă recrystalizare dintr-o cantitate minimă de apă, p.t.=174-175°C, iar $[\alpha]_D^{25} = +40^\circ$ (4% în etanol). După a doua recrystalizare: $[\alpha]_D^{25} = +47^\circ$.

Observații:

-Experiența poate fi considerată terminată în acest moment.

-Pentru a se obține *D* și *L* Phe, se refluxează compușii (37) și (38) cu HCl 20%, timp de 5 ore.

D-Phe: se recrystalizează din apă.

$$[\alpha]_D^{20} = +33,5 \pm 0,5^\circ \text{ (2\% în apă)}$$

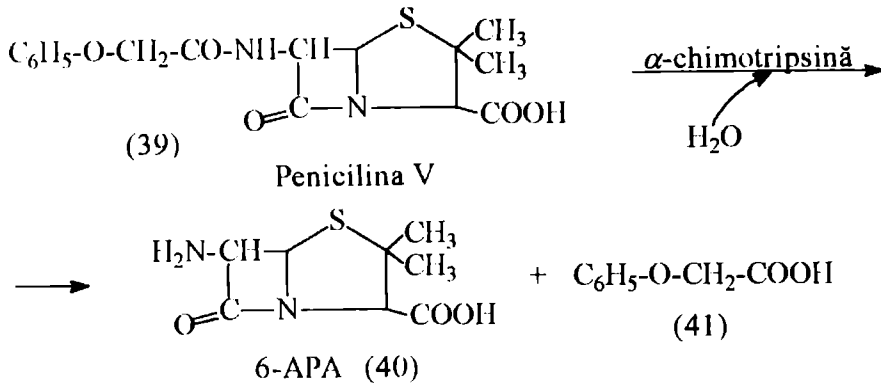
L-Phe: se recrystalizează din apă.

$$[\alpha]_D^{20} = -32 \pm 1^\circ \text{ (2\% în apă)}$$

III.2.Obținerea acidului 6-aminopenicilanic

Acidul 6-aminopenicilanic (6-APA) este un intermediar prețios în semisinteza penicinelor și a cefalosporinelor. El se poate obține prin hidroliza enzimatică a penicinelor de fermentație.

Pentru aceasta, ca substrat se poate folosi penicilina V (39):



Materiale și aparatură necesare:

- TRIS (trihidroximetilen-metilamină) 2,4g;
- CaCl₂;
- HCl 1N;
- etanol;
- sare de potasiu a penicilinei V 5g (0,013 moli);
- chimotripsină A 10mg (sau echivalentul său în chimotripsină imobilizată, obținut prin reticularea a 14mg enzimă);
- eter etilic;
- Na₂SO₄ anh.;
- pH-metru cu electrod mixt standardizat.

Mod de lucru:

2,4g TRIS se aduc la 150ml cu apă distilată și se introduc într-un vas de reacție, prevăzut cu agitare magnetică. Pentru activare, se adaugă 55ml soluție de CaCl₂ 5%. Se începe agitarea (magnetică) și se ajustează pH-ul amestecului la 8,1 cu HCl 1N, în prezența unui electrod mixt legat de un pH-metru.

Din această soluție tamponată se rețin 150ml, la care se adaugă 5g sare de potasiu a penicilinei V.

Soluția substratului în tampon se plasează apoi într-un flacon prevăzut cu agitator mecanic și electrod mixt de pH introdus în masa de reacție. Se adaugă, sub agitare, 10mg chimotripsină A (sau echivalentul în enzimă reticulantă) și se termostatează la 37°C. Reacția durează 2 ore la această temperatură.

După scurgerea timpului indicat, reacția se stopează prin denaturarea enzimei cu 3-4ml etanol, iar pH-ul amestecului se ajustează cu HCl 1N la 7. Precipită 6-APA (40).

Pentru îndepărtarea resturilor de acid fenoxicetic (41) se dizolvă 6-APA brut într-o cantitate minimă de eter etilic și se spală într-o pâlnie de separare cu câteva porțiuni de apă distilată. Se separă stratul organic și se usucă pe Na₂SO₄ anh.

După uscare, se filtrează soluția eterică și se liofilizează la presiune redusă, într-un evaporator rotativ. Se obțin aprox. 2,7g 6-APA, cu p.t.=208°C.

III.3. Izolarea inhibitorului natural al tripsinei prin cromatografie afină

Inhibitorul natural al tripsinei se izolează din extract de cartofi, folosind ca suport afin (fază staționară) tripsina imobilizată.

Metoda este selectivă, eficientă, rapidă și simplă și se bazează pe specificitatea interacțiilor biomoleculare, fiind un exemplu de izolare a unei substanțe biologice active cu enzime imobilizate.

III.3.1. Obținerea extractului de cartofi cu conținut în inhibitor al tripsinei

Tuberculii de cartofi conțin inhibitori ai unor proteaze implicate în metabolismul proteic ca: α -chimotripsina, tripsina, carboxipeptidazele A și B. Acești inhibitori protejează tuberculii față de atacul microorganismelor și fungilor.

Extractul brut de inhibitor proteic din cartofi este deci un amestec, din care se pot izola componentele prin cromatografie afină (utilizând ca liganzi enzimele specifice).

Materiale și aparatură necesare:

- tuberculi de cartofi 1200g;
- ditionit de sodiu-soluție 0,7%;
- HCl 6N;
- omogenizator Potter;
- (NH₄)₂SO₄.

Mod de lucru:

1200g tuberculi de cartofi spălați se mărunțesc și se umectează cu o soluție de ditionat de sodiu 0,7%. Amestecul se omogenizează cu ditionat într-un omogenizator de tip Potter. Omogenizatul obținut se filtrează la trompă și se presează pe pâlnia Büchner cu ajutorul unui dop de sticlă.

Filtratul se aduce la pH=3,0 cu ajutorul unei soluții apoase de HCl 6N. Amestecul acidulat se centrifughează la 4000 rpm, timp de 30 min.

Pentru purificarea parțială a extractului, se decantează supernatantul limpede și se plasează pe o baie de gheață, după care se saturează prin adăugare de (NH₄)₂SO₄, până la o saturație de 70%. Se agită timp de o oră, după care se separă precipitatul prin centrifugare la 4000rpm, timp de 30 min. și se filtrează la trompă. Precipitatul se spală pe pâlnia Büchner cu o soluție de (NH₄)₂SO₄ 70%, pentru îndepărtarea completă a ditionitului. Precipitatul astfel spălat se dizolvă în 100ml apă distilată, sub agitare timp de o oră.

Soluția este supusă unui tratament termic la 80°C timp de 5 min., pentru precipitarea proteinelor, după care se filtrează pe pâlnia Büchner.

Rezultă un filtrat limpede care conține inhibitor de tripsină.

III.3.2. Izolarea inhibitorului tripsinei prin cromatografie afină

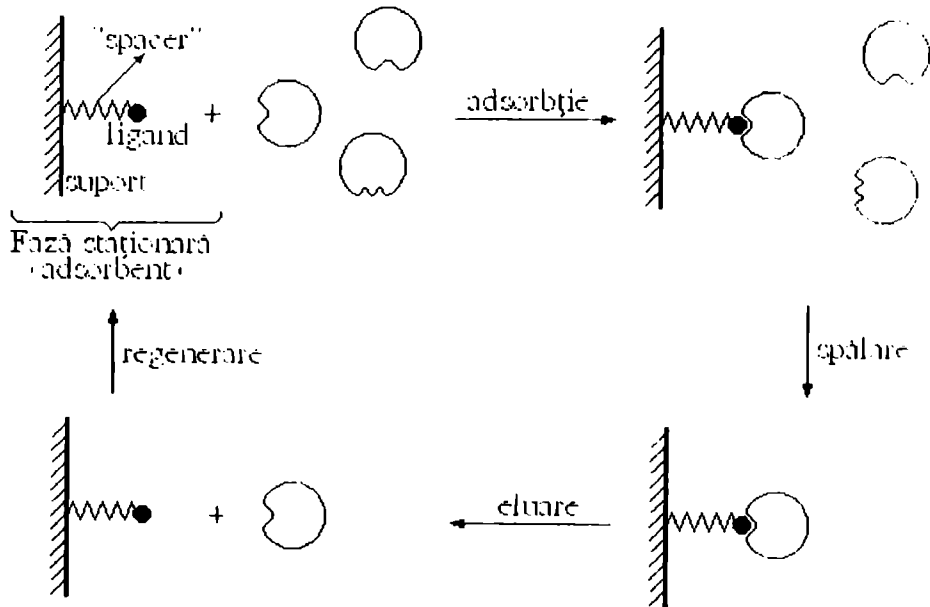
Cromatografia afină, o variantă a cromatografiei se adsorbție, se bazează pe același principiu general: purificarea sau extracția unei substanțe dintr-o soluție se face prin interacțiunile specifice, reversibile, dintre faza staționară (adsorbentul) și substanțele de izolat sau de purificat. Etapa următoare constă în eluția (desorbția) compușilor reținuți specific pe faza staționară.

Faza staționară (adsorbentul) este formată în cazul cromatografiei afine cu enzime imobilizate dintr-un suport poros pe care a fost imobilizată în prealabil enzima (ligandul propriu-zis).

Enzimele se leagă de suport prin legături covalente, de obicei la capătul unui "spacer", pentru a se evita efectele sterice și electrostatice nedorite, care pot împiedica difuzia substratului sau inhibitorului specific la centri activi ai biocatalizatorului. În esență, etapele cromatografiei afine pot fi schematizate în figura nr. 13.

Figura nr.13

Etapele cromatografiei afine



În acest mod, trecând un amestec conținând diverse proteine printr-o coloană umplută cu un adsorbent specific doar una dintre ele, aceasta va fi reținută, în timp ce restul proteinelor și alte substanțe din amestecul respectiv se îndepărtează din coloană prin spălare.

Ca suporturi se poate folosi o gamă largă de substanțe organice (poliacrilamide, poli(hidroxi)(met)acrilati etc.) sau anorganice (sticlă, ceramică etc.) preactivate în prealabil prin fixarea pe suprafața lor a unor grupe reactive, capabile de a forma legături covalente cu grupele libere din moleculele enzimelor.

Suporturile trebuie să fie poroase, rigide, uniforme ca dimensiuni, de formă sferică (perlată), nellexibile (pentru evitarea compactării în coloană) și inerte chimic în condițiile în care se utilizează.

Materiale și aparatură necesare:

- gel enzimatic perlat, conținând 4,8mg tripsină/ml gel 1,5ml;
- tampon TRIS-HCl 0,2M, pH=7,8;
- extract de cartofi;
- KCl 0,5M în HCl 0,1N;
- NaOH 1N;
- (NH₄)₂SO₄;
- pH-metru cu electrod mixt standardizat.

Mod de lucru:

15ml gel enzimatic perlat, conținând 4,8mg tripsină/ml gel se suspendă prin agitare într-o soluție tampon TRIS-HCl 0,2M, pH=7,8, după care se încarcă într-o coloană cromatografică (patul de gel 1,4x10cm).

În coloană se introduc 6ml extract de cartofi (cu concentrație proteică 12,5mg/ml, care conține inhibitorul natural al tripsinei (vezi observație).

În continuare, pe la partea superioară a coloanei se aplică tamponul (TRIS-HCl 0,2M, pH=7,8), până la îndepărtarea tuturor componentelor din extractul de cartofi nereținute pe coloană (lipsa extincției la 280nm). După spălare, se aplică eluentul format dintr-o soluție de KCl 0,5M în HCl 0,1N, care deplasează inhibitorul de pe suportul afin. Se recoltează probe de câte 3ml, care se citesc la 280nm, trasând un grafic al D.O. în funcție de numărul fracțiilor (1, 2, 3 etc.). Frațiunile proteice acide se neutralizează cu NaOH 0,1N la pH=7 (prin titrare cu ajutorul unui pH-metru).

După neutralizare, în fracțiunile culese se determină activitatea inhibitorului asupra tripsinei, după metoda descrisă în continuare.

În general, 5mg inhibitor eluat din coloana cromatografică corespunde unei capacități de legare a adsorbentului de 0,33mg inhibitor/ml gel.

Observație: Pentru creșterea concentrației proteice în extractul de cartofi supus cromatografiei afine, acesta se tratează în prealabil cu sulfat de amoniu 80%, proteinele precipitate și separate prin centrifugare reluându-se cu un volum minim de tampon TRIS-HCl.

III.3.3.Determinarea activității inhibitorului tripsinei izolat prin cromatografie afină

Pentru evaluarea acțiunii inhibitorului eluat din coloana cromatografică, se determină activitatea tripsinei folosind ca substrat cazeina, în absența și prezența inhibitorului. Se folosesc câte 0,5ml gel depus de tripsină imobilizată pentru fiecare determinare.

Se lucrează cu fracțiunile eluate din coloană, plus o probă în care se va lucra în absența inhibitorului. Se iau în lucru câte 0,1ml din fiecare fracție eluată.

Materiale necesare:

- fracțiunile eluate pe coloană;
- tripsină;
- tampon TRIS-HCl 0,2M, pH=7,8;
- CCl₃COOH 5%;
- cazeină.

Mod de lucru:

Se iau, în eprubete diferite, câte 0,1ml din fracțiunile eluate pe coloană, plus o eprubetă în care se va lucra în absența inhibitorului.

În fiecare dintre ele se introduc câte 0,1ml soluție tripsină 0,05% în tampon TRIS-HCl 0,2M, pH=7,8. Probele se incubează 30 min. la 37°C, după care reacția este stopată adăugând în fiecare dintre ele câte 3ml soluție 5% de CCl₃COOH.

După 25-30 min. se filtrează cazeina nedigerată. În filtratele care conțin proteinele digerate se face determinarea colorimetrică conform modului descris anterior (pag 65) Activitatea enzimatică se va exprima în μmoli tirozină/min./mg proteină.

Activitatea inhibitorare se exprimă în unități de inhibiție/ml probă (U.I/ml); unitatea de inhibiție este cantitatea de inhibitor care produce scăderea activității enzimatică cu 1μmol tirozină/min. U.I. se exprimă prin relația:

$$U.I. = A - B, \text{ în care:}$$

A= activitatea proteolitică a tripsinei în proba fără inhibitor;

B= activitatea tripsinei în fracțiunile eluate din coloană (în prezența inhibitorului).

Se va trasa pentru probele cu inhibitor o curbă a variației U.I. în funcție de numărul probei.

III.4. Dozarea activității unor enzime cu ajutorul substratelor cromogene

Substratele cromogene specifice sunt utilizate pe scară largă pentru determinarea activității unor enzime, metodele de dozare fiind accesibile, rapide, sensibile și ușor reproductibile.

Un substrat cromogen se obține în general prin imobilizarea unui colorant organic (azoic, antrachinonic, triazinic etc.) pe un suport macromolecular insolubil (celuloză, amidon, collagen, elastină, cazeină etc.). Imobilizatului astfel obținut se hidrolizează cu o enzimă specifică suportului (celuloză, amilază, collagenază, elastază etc.). În urma scindării enzimatică are loc eliberarea în soluție a colorantului, care poate fi dozat spectrofotometric, estimându-se astfel activitatea biocatalitică a enzimei.

Legăturile stabilite între suport și colorant pot fi covalente sau necovalente, ca și legături mixte, mecanismul formării acestora nefiind complet elucidat. Se pare că o mare parte a colorantului este reținută prin adsorbție.

Metodele utilizate pentru dozarea enzimelor cu ajutorul substratelor cromogene cuprind în general mai multe etape:

- obținerea substratului cromogen în urma fixării colorantului pe suport;
- incubarea substratului cromogen cu soluția enzimei, un anumit timp, la o anumită temperatură; are loc scindarea substratului cu formarea unor fragmente colorate, solubile;
- îndepărtarea din mediul de reacție, prin filtrare sau centrifugare, a substratului nedigerat și a fragmentelor insolubile;
- colorimetrarea supernatantului la o lungime de undă corespunzătoare absorbției maxime a colorantului respectiv;
- transformarea absorbanțelor în unități industriale de exprimare a activității catalitice a enzimei.

Substratul cromogen poate fi utilizat în sistem "batch" (vas cu agitare) sau într-o coloană cu pat compact.

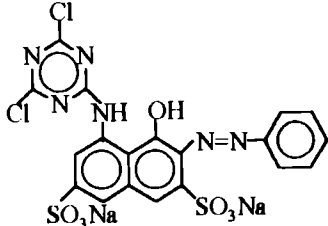
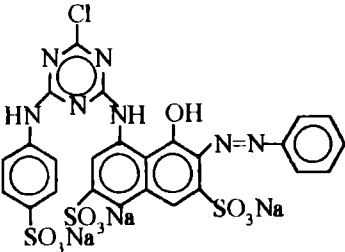
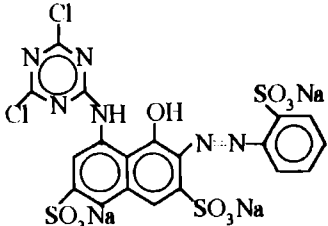
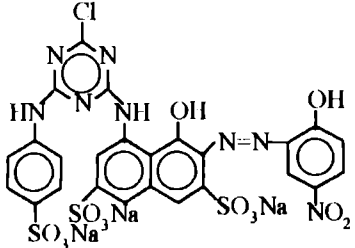
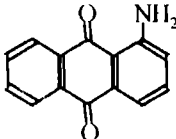
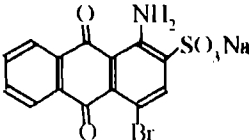
Determinarea activității enzimatică a α -amilazei

Ca substrat cromogen specific se utilizează amidonul granulat, reticulat cu epiclorigidrină (pag.6), activat cu *p*-benzoquinonă (pag.21) și cuplat cu un colorant reactiv.

În tabelul nr.13 sunt indicați câțiva coloranți utilizați pentru obținerea acestor substraturi, ca și absorbțiile lor caracteristice din spectrele electronice.

Tabelul nr.13

Coloranți reactivi utilizați pentru obținerea substratelor cromogene
specifice α -amilazei

| Nr. crt. | Tipuri de coloranți | Structura coloranților | λ_{max} (nm) |
|----------|---------------------------------|---|----------------------|
| 0 | 1 | 2 | 3 |
| I | Coloranți triazinici | <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> <div style="margin-right: 10px;">-Roșu B 5A</div> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="margin-left: 10px;">560</div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> <div style="margin-right: 10px;">-Roșu M 3A</div> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="margin-left: 10px;">530</div> </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">-Roșu MB</div> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="margin-left: 10px;">540</div> </div> </div> | |
| | -Violet M 3R | <div style="text-align: center;">  </div> | 550 |
| II | Coloranți antrachinonici | <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="margin-bottom: 10px;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> <div style="margin-right: 10px;">-Aminoantrachinonă</div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">-Acid bromaminic</div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> </div> </div> | |

Substratele cromogene obținute pe această cale sunt stabile și pot fi utilizate atât în coloane cât și în sistemul "batch".

III.4.1. Metoda generală de obținere a substratelor cromogene pentru dozarea α -amilazel

Se folosește amidon granulat, reticulat cu epichlorhidrină și activat cu *p*-benzochinonă, care se amestecă cu o cantitate corespunzătoare de tampon fosfat 0,1M, pH=8, în care a fost dizolvat colorantul. Se agită la temperatura camerei, 12-15 ore, după care se filtrează pe pâlnia Büchner pentru îndepărtarea colorantului nereținut. După spălarea cu apă a substratului cromogen (până când apa de spălare rămâne incoloră), se spală cu puțină acetonă, pentru îndepărtarea apei. Se usucă în aer.

Materiale necesare:

- amidon reticulat cu epichlorhidrină și activat cu *p*-benzochinonă 1g;
- soluție 1% de uree în Na₂CO₃ 1%;
- colorant (tabelul nr. 13) 0,4g;
- acetonă.

Mod de lucru:

Într-un pahar Berzelius de 100ml se introduce un amestec format din 1g amidon reticulat și activat și 30ml soluție de uree 1% în Na₂CO₃ 1%, care se agită timp de 5 min. pe baia de apă la 75-80°C. La acest amestec se adaugă sub agitare 0,4g colorant. Se continuă agitarea încă o oră la 75-80°C și apoi 15-20 min. la 100°C.

Amestecul de reacție se răcește și se filtrează substratul cromogen rezultat pe o pâlnie Büchner, la presiune redusă. Se spală pe pâlnie cu apă distilată pentru îndepărtarea totală a colorantului nereținut și apoi cu puțină acetonă. Se usucă în aer.

III.4.2. Determinarea activității enzimatice a α -amilazel

Pentru estimarea activității enzimatice a α -amilazei față de substratele cromogene obținute pe baza coloranților specificați în tabelul nr.13, se folosesc două metode:

-metoda colorimetrică, bazată pe măsurarea extincției colorantului trecut în soluție în urma scindării amidonului;

-metoda gel-difuziei radiale, care se bazează pe același principiu, măsurându-se razele zonelor de difuzie ale colorantului într-un gel de agaroză sau de alcool polivinilic (PVA).

III.4.2.1. Metoda colorimetrică

A. Scindarea substratelor cromogene cu α -amilază

Materiale necesare:

- substrat cromogen-uscalt;
- α -amilază;
- tampon fosfat 0,05mM, pH=6,9;
- HCl 0,5M;
- NaOH 0,5N.

Mod de lucru:

1° Pentru substratele de coloranți antrachinonici

Se amestecă în câteva eprubete câte 75mg substrat cromogen cu 5ml tampon fosfat 0,05mM, pH=6,9, pentru gonflare. După gonflare, se adaugă în fiecare eprubetă câte 1ml soluție de α -amilază de diverse concentrații (0,05-0,20mg/ml).

Se incubează amestecurile timp de 15 min. la 37°C, după care se stopează reacția adăugând în fiecare eprubetă câte 1ml HCl 0,5M. Se centrifughează amestecurile de reacție 5 min. la turație joasă (2000g), iar supernatantul se colorimetrează față de apă distilată la lungimea de undă corespunzătoare colorantului utilizat la obținerea substratului cromogen.

Se trasează o curbă a variației D.O./min în funcție de concentrația α -amilazei utilizate în probele inițiale (mg/ml).

2° Pentru substrate pe bază de coloranți triazinici

Se lucrează în paralel cu mai multe eprubete, ca la punctul 1°, folosind diverse concentrații ale soluției de α -amilază, cuprinse între 0,25 și 1mg/ml; pentru stoparea reacției se introduce în fiecare probă câte 2ml NaOH 0,5N.

După centrifugare, se colorimetrează supernatantele la λ corespunzătoare maximumului de absorbție al colorantului utilizat pentru obținerea substratului cromogen (tabelul nr.13). Se trasează curba dependenței D.O. de concentrația enzimei din probele studiate.

3° Transformarea în unități internaționale (U.I.) a activității α -amilazei

Se utilizează o metodă de determinare a activității α -amilazice față de amidon, trasându-se câte o curbă a dependenței D.O. față de diferitele concentrații de enzimă luată în probă. Pentru a se putea face o comparație cât mai precisă, se vor folosi aceleași concentrații de enzimă ca și cele luate în lucru pentru substratele cromogene.

Dintre metodele indicate în literatură, am ales metoda Hostettler și colab.

Principiul metodei:

Sub acțiunea hidrolazică a α -amilazei, amidonul este scindat în fragmente mai mici (oligozaharide reducătoare); prezența grupelor semiacetalee libere din aceste fragmente se evidențiază cu reactivul cu acid 3,5-dinitrosalicilic.

Materiale necesare:

- 1) tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,016mM, pII=6 în NaCl mM;
- 2) soluție de amidon 1% în tamponul 1);
- 3) reactiv cu acid 3,5-dinitrosalicilic (pag.35);
- 4) soluții de α -amilază.

Se lucrează cu soluții apoase de α -amilază având concentrațiile identice cu cele utilizate în cazul substratelor cromogene și anume:

-pentru substratele pe bază de coloranți antrachinonici – cu soluții de enzimă cu concentrații cuprinse între 0,05-0,20mg/ml;

-pentru substratele pe bază de coloranți triazinici – cu soluții de enzimă de concentrații cuprinse între 0,25-1mg/ml.

Mod de lucru general:

Se amestecă 1ml soluție tampon 1) cu 1ml soluție substrat 2) și 1ml soluție enzimă în apă distilată. Se incubă proba timp de 10 min. la 25°C, apoi se stopează reacția cu 2ml reactiv 3) cu acid dinitrosalicilic (DNS). Se incubă din nou, 5 min., pe baia de apă la fierbere. Proba se răcește și se aduce la un volum final de 20ml cu apă distilată. Determinările se fac în paralel cu o probă martor (pentru momentul zero) preparată ca și proba de analizat, în care soluția de enzimă se introduce după reactivul DNS.

Se colorimetrează martorul și proba de analizat, față de apă distilată, la 546nm. Dacă diferența D.O. probă - D.O. martor este peste 1,5, se diluează soluția de enzimă.

Se trasează curba dependenței D.O. de concentrațiile de enzimă luate în probe.

Se determină $\Delta D.O.$ față de curbele corespunzătoare, obținute cu ajutorul substratului cromogen. Activitatea enzimatică se va exprima prin relația:

$$A.E. = \chi \cdot \Delta D.O. \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}, \text{ în care:}$$

χ = coeficientul de corecție pentru substratul cromogen utilizat (tabel nr.14);

$\Delta D.O./\text{min}$ = diferența dintre extincțiile rezultate pentru fiecare substrat cromogen și pentru fiecare concentrație de enzimă față de metoda Hostettler de determinare a activității α -amilazei, pentru aceleași concentrații de enzimă.

Tabelul nr.14

Valori ale coeficienților de corecție χ pentru diverse substraturi cromogene de amidon

| Nr. crt. | Substrat cromogen pe baza colorantului | χ |
|----------|--|--------|
| 1 | Galben auriu M 2R | 9,30 |
| 2 | Albastru MV | 38,00 |
| 3 | Violet M 3R | 50,00 |
| 4 | Roșu M13 | 50,36 |
| 5 | Roșu M 3A | 66,60 |
| 6 | Roșu B 5A | 200,00 |

III.4.2.2. Determinarea activității α -amilazei prin metoda gel-difuziei radiale

Principiul metodei constă în difuzia colorantului eliberat într-un gel de agatoză sau de PVA, în urma scindării substratului cromogen cu α -amilază. Se măsoară razele zonelor de difuzie, care depind de cantitatea de enzimă luată în probă.

Materiale necesare:

- agar 1% (în apă distilată) 100ml;
- substrat cromogen 1g;
- α -amilază: soluții apoase de concentrații cuprinse între:
 - 0,05-0,20mg/ml pentru coloranții antrachinonici;
 - 0,25-1mg/ml pentru coloranții triazinici și pentru amidonul necolorat;
- plăci de sticlă (8x8 cm);
- micropipete;
- soluție de iod 0,1N (Lugol).

Mod de lucru:

La 100ml soluție de agar 1% sau de PVA 1,5% încălzită pe baia de apă la 60-70°C se adaugă 1g substrat cromogen în stare fin pulverizată și se omogenizează cu o baghetă. Amestecul omogen se întinde pe plăci de sticlă de 8x8 cm, bine degresate și spălate în prealabil. Pe fiecare placă se toarnă aprox. 20ml amestec, astfel încât la răcire să rezulte un strat de gel de aprox. 3mm grosime. În centrul fiecărei plăci se practică un godelu cu Φ aprox. 3,5mm, în care se pipetează 30 μ l soluție de α -amilază de concentrația corespunzătoare. Se lasă să decurgă difuzia în atmosferă umedă, la temperatura camerei, timp de 20 ore.

Se citește diametrul zonei de difuzie (în mm).

Pentru construirea unei curbe etalon se procedează în același mod, folosind concentrații de α -amilază cuprinse între 0,03-1mg/ml. Se trasează o curbă a variației diametrului zonei de difuzie (în mm) în funcție de log concentrației de α -amilază (în mg/ml).

Pentru vizualizarea zonelor de difuzie se folosește o soluție Lugol, în care se scufundă plăcile uscate.

Observație:

Soluția Lugol (de iod în iodură de potasiu) se prepară astfel: în 100ml apă se dizolvă 10g iodură de potasiu. La soluția obținută se introduce 5g iod și se agită până la dizolvare completă.

Se păstrează în sticle bune.

SOLUȚII

| Tipul soluției | Modul de exprimare a concentrației*) | Definiție |
|-----------------------------|--------------------------------------|--|
| <i>I.MASĂ/MASĂ</i> | | |
| Procentuală de masă (%) | Masă % | Grame de substanță dizolvată în 100g soluție |
| Molală (m) | Moli/1000g solvent | Moli, respectiv atomi-gram de substanță dizolvată în 1000g solvent |
| <i>II.MASĂ/VOLUM</i> | | |
| Molară (M) | Moli/L; Atomi-gram/L | Moli, respectiv atomi-gram de substanță dizolvată într-un L de soluție |
| Normală (N) | E/L | Echivalenți-gram de substanță dizolvată într-un L de soluție |
| Procentuală volumetrică (%) | Masă % (volum soluție) | Grame de substanță dizolvată în 100 mL de soluție |
| <i>III.VOLUM/VOLUM</i> | | |
| Procentuală în volume (%) | Vol (%) | Mililitri de substanță dizolvată în 100mL de soluție |

*)Concentrația unei soluții ce conține mai multe substanțe dizolvate (A, B, C ...) se poate exprima și prin fracții molare.

Exemplu:
$$x_A = \frac{n_A}{n_A + n_B + n_C + \dots}$$

unde x_A este fracția molară a substanței A, iar n_A, n_B, n_C, \dots reprezintă, respectiv, numărul de moli din substanțele A, B, C, ...

Suma fracțiilor molare este egală cu unitatea:

$$x_A + x_B + x_C + \dots = 1$$

ANEXA NR.2

Prefixe pentru multipli și subdiviziuni în sistemul internațional de unități

| Multipli | Prefix | Simbol | Subdiviziuni | Prefix | Simbol |
|-----------|--------|--------|--------------|--------|--------|
| 10^1 | deca | da | 10^{-1} | deci | d |
| 10^2 | hecto | h | 10^{-2} | centi | c |
| 10^3 | kilo | k | 10^{-3} | mili | m |
| 10^6 | mega | M | 10^{-6} | micro | μ |
| 10^9 | giga | G | 10^{-9} | nano | n |
| 10^{12} | tera | T | 10^{-12} | pico | p |
| | | | 10^{-15} | fento | f |
| | | | 10^{-18} | ato | a |

Filtre utilizate în spectrofotometrie

| Lungimea de undă λ (nm) | Culoarea filtrului | Culoarea observată |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|
| 400 | Violet | Galben-verzui |
| 425 | Albastru-indigo | Galben |
| 450 | Albastru | Oranj |
| 490 | Verde-albastru | Roșu |
| 510 | Verde | Purpuriu |
| 530 | Galben-verde | Violet |
| 550 | Galben | Albastru-indigo |
| 590 | Oranj | Albastru |
| 640 | Roșu | Verde-albăstrui |
| 730 | Roșu închis | Verde |

ANEXA NR.4

Transformarea transmisiei în extincție (absorbanță, densitate optică)
(după formula $E = 2 - \log T$)

| Transmisie % | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 |
|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 0 | -- | 2,699 | 2,398 | 2,222 | 2,097 |
| 1 | 2,000 | 1,921 | 1,854 | 1,796 | 1,745 |
| 2 | 1,699 | 1,658 | 1,620 | 1,585 | 1,553 |
| 3 | 1,523 | 1,495 | 1,469 | 1,444 | 1,420 |
| 4 | 1,398 | 1,377 | 1,357 | 1,337 | 1,319 |
| 5 | 1,301 | 1,284 | 1,268 | 1,252 | 1,237 |
| 6 | 1,222 | 1,208 | 1,194 | 1,180 | 1,168 |
| 7 | 1,155 | 1,143 | 1,131 | 1,119 | 1,108 |
| 8 | 1,097 | 1,086 | 1,076 | 1,066 | 1,055 |
| 9 | 1,046 | 1,036 | 1,027 | 1,018 | 1,009 |
| 10 | 1,0000 | 0,9914 | 0,9830 | 0,9747 | 0,9666 |
| 11 | 0,9586 | 0,9508 | 0,9431 | 0,9356 | 0,9281 |
| 12 | 0,9208 | 0,9137 | 0,9066 | 0,8996 | 0,8928 |
| 13 | 0,8861 | 0,8794 | 0,8729 | 0,8665 | 0,8601 |
| 14 | 0,8539 | 0,8477 | 0,8416 | 0,8356 | 0,8297 |
| 15 | 0,8239 | 0,8182 | 0,8125 | 0,8069 | 0,8013 |
| 16 | 0,7959 | 0,7905 | 0,7852 | 0,7799 | 0,7747 |
| 17 | 0,7696 | 0,7645 | 0,7594 | 0,7545 | 0,7496 |
| 18 | 0,7447 | 0,7399 | 0,7352 | 0,7305 | 0,7258 |
| 19 | 0,7212 | 0,7167 | 0,7122 | 0,7077 | 0,7033 |
| 20 | 0,6990 | 0,6946 | 0,6904 | 0,6861 | 0,6819 |
| 21 | 0,6768 | 0,6737 | 0,6696 | 0,6655 | 0,6615 |
| 22 | 0,6576 | 0,6536 | 0,6498 | 0,6459 | 0,6421 |
| 23 | 0,6383 | 0,6345 | 0,6308 | 0,6271 | 0,6234 |
| 24 | 0,6198 | 0,6162 | 0,6126 | 0,6091 | 0,6056 |
| 25 | 0,6021 | 0,5986 | 0,5952 | 0,5918 | 0,5884 |
| 26 | 0,5850 | 0,5817 | 0,5784 | 0,5751 | 0,5719 |
| 27 | 0,5686 | 0,5654 | 0,5622 | 0,5591 | 0,5560 |
| 28 | 0,5528 | 0,5498 | 0,5467 | 0,5436 | 0,5406 |
| 29 | 0,5376 | 0,5346 | 0,5317 | 0,5287 | 0,5258 |
| 30 | 0,5228 | 0,5200 | 0,5171 | 0,5143 | 0,5114 |
| 31 | 0,5086 | 0,5058 | 0,5031 | 0,5003 | 0,4976 |
| 32 | 0,4949 | 0,4921 | 0,4895 | 0,4868 | 0,4841 |
| 33 | 0,4815 | 0,4789 | 0,4763 | 0,4737 | 0,4711 |
| 34 | 0,4685 | 0,4660 | 0,4634 | 0,4609 | 0,4584 |
| 35 | 0,4559 | 0,4535 | 0,4510 | 0,4486 | 0,4461 |
| 36 | 0,4437 | 0,4413 | 0,4389 | 0,4365 | 0,4342 |
| 37 | 0,4318 | 0,4295 | 0,4271 | 0,4248 | 0,4225 |
| 38 | 0,4202 | 0,4179 | 0,4157 | 0,4134 | 0,4112 |
| 39 | 0,4089 | 0,4067 | 0,4045 | 0,4023 | 0,4001 |
| 40 | 0,3979 | 0,3958 | 0,3936 | 0,3915 | 0,3893 |

(continuare ANEXA NR.4)

| Transmisie % | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 |
|--------------|--------|---------|--------|--------|--------|
| 41 | 0,3872 | 0,3851 | 0,3830 | 0,3809 | 0,3788 |
| 42 | 0,3768 | 0,3747 | 0,3726 | 0,3706 | 0,3685 |
| 43 | 0,3665 | 0,3645 | 0,3625 | 0,3605 | 0,3585 |
| 44 | 0,3565 | 0,3546 | 0,3526 | 0,3507 | 0,3487 |
| 45 | 0,3468 | 0,3449 | 0,3429 | 0,3410 | 0,3391 |
| 46 | 0,3372 | 0,3354 | 0,3335 | 0,3316 | 0,3298 |
| 47 | 0,3279 | 0,3260 | 0,3242 | 0,3224 | 0,3206 |
| 48 | 0,3188 | 0,3170 | 0,3152 | 0,3134 | 0,3116 |
| 49 | 0,3098 | 0,3080 | 0,3063 | 0,3045 | 0,3028 |
| 50 | 0,3010 | 0,2993 | 0,2975 | 0,2959 | 0,2941 |
| 51 | 0,2924 | 0,2907 | 0,2890 | 0,2873 | 0,2857 |
| 52 | 0,2840 | 0,2823 | 0,2807 | 0,2790 | 0,2774 |
| 53 | 0,2757 | 0,2741 | 0,2725 | 0,2708 | 0,2692 |
| 54 | 0,2676 | 0,2660 | 0,2644 | 0,2628 | 0,2412 |
| 55 | 0,2596 | 0,2581 | 0,2565 | 0,2549 | 0,2534 |
| 56 | 0,2518 | 0,2503 | 0,2487 | 0,2472 | 0,2457 |
| 57 | 0,2441 | 0,2426 | 0,2411 | 0,2396 | 0,2381 |
| 58 | 0,2366 | 0,2351 | 0,2336 | 0,2321 | 0,2306 |
| 59 | 0,2291 | 0,2277 | 0,2262 | 0,2248 | 0,2233 |
| 60 | 0,2219 | 0,2204 | 0,2190 | 0,2175 | 0,2161 |
| 61 | 0,2147 | 0,2132 | 0,2118 | 0,2104 | 0,2090 |
| 62 | 0,2076 | 0,2062 | 0,2048 | 0,2034 | 0,2020 |
| 63 | 0,2007 | 0,1993 | 0,1979 | 0,1965 | 0,1952 |
| 64 | 0,1938 | 0,1925 | 0,1911 | 0,1898 | 0,1884 |
| 65 | 0,1871 | 0,1857 | 0,1844 | 0,1831 | 0,1818 |
| 66 | 0,1805 | 0,1791 | 0,1778 | 0,1765 | 0,1752 |
| 67 | 0,1739 | 0,1726 | 0,1713 | 0,1701 | 0,1688 |
| 68 | 0,1675 | 0,1662 | 0,1649 | 0,1637 | 0,1624 |
| 69 | 0,1612 | 0,1599 | 0,1586 | 0,1574 | 0,1562 |
| 70 | 0,1549 | 0,1537 | 0,1524 | 0,1512 | 0,1500 |
| 71 | 0,1487 | 0,14705 | 0,1463 | 0,1451 | 0,1439 |
| 72 | 0,1427 | 0,1415 | 0,1403 | 0,1391 | 0,1379 |
| 73 | 0,1367 | 0,1355 | 0,1343 | 0,1331 | 0,1319 |
| 74 | 0,1308 | 0,1296 | 0,1284 | 0,1273 | 0,1261 |
| 75 | 0,1249 | 0,1238 | 0,1226 | 0,1215 | 0,1203 |
| 76 | 0,1192 | 0,1180 | 0,1169 | 0,1158 | 0,1146 |
| 77 | 0,1135 | 0,1124 | 0,1113 | 0,1102 | 0,1090 |
| 78 | 0,1079 | 0,1068 | 0,1057 | 0,1046 | 0,1035 |
| 79 | 0,1024 | 0,1013 | 0,1002 | 0,0991 | 0,0980 |
| 80 | 0,0969 | 0,0958 | 0,0948 | 0,0937 | 0,0926 |
| 81 | 0,0915 | 0,0904 | 0,0894 | 0,0883 | 0,0872 |
| 82 | 0,0862 | 0,0851 | 0,0841 | 0,0830 | 0,0820 |
| 83 | 0,0809 | 0,0799 | 0,0788 | 0,0778 | 0,0767 |
| 84 | 0,0757 | 0,0747 | 0,0736 | 0,0726 | 0,0716 |
| 85 | 0,0706 | 0,0696 | 0,0685 | 0,0675 | 0,0665 |

(continuare ANEXA NR.4)

| Transmisie % | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 |
|--------------|--------|---------|--------|--------|--------|
| 86 | 0,0655 | 0,0645 | 0,0635 | 0,0625 | 0,0615 |
| 87 | 0,0605 | 0,0595 | 0,0585 | 0,0575 | 0,0565 |
| 88 | 0,0555 | 0,0545 | 0,0535 | 0,0526 | 0,0516 |
| 89 | 0,0506 | 0,0496 | 0,0487 | 0,0477 | 0,0467 |
| 90 | 0,0458 | 0,0448 | 0,0438 | 0,0429 | 0,0419 |
| 91 | 0,0410 | 0,0400 | 0,0391 | 0,0381 | 0,0371 |
| 92 | 0,0362 | 0,0353 | 0,0343 | 0,0334 | 0,0325 |
| 93 | 0,0315 | 0,0306 | 0,0296 | 0,0287 | 0,0278 |
| 94 | 0,0269 | 0,0260 | 0,0250 | 0,0241 | 0,0232 |
| 95 | 0,0223 | 0,02140 | 0,0204 | 0,0195 | 0,0186 |
| 96 | 0,0177 | 0,0168 | 0,0159 | 0,0150 | 0,0141 |
| 97 | 0,0132 | 0,0123 | 0,0114 | 0,0106 | 0,0097 |
| 98 | 0,0088 | 0,0079 | 0,0070 | 0,0061 | 0,0052 |
| 99 | 0,0044 | 0,0035 | 0,0026 | 0,0017 | 0,0009 |
| 100 | 0,0000 | | | | |

ANEXA NR.5

Unități și subdiviziuni

1. Lungime

| Denumire | Simbol | nm | μm | mm | cm | dm | m |
|---------------------------|----------------------------|-----------|---------------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Angström | Å | 10^{-1} | 10^{-4} | 10^{-7} | 10^{-8} | 10^{-9} | 10^{-10} |
| Nanometru (milimicron) | nm ($m\mu$) | 1 | 10^{-3} | 10^{-6} | 10^{-7} | 10^{-8} | 10^{-9} |
| Micrometru (micron) | μm (μ) | 10^3 | 1 | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} |
| Milimetru | mm | 10^6 | 10^3 | 1 | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} |
| Centimetru | cm | 10^7 | 10^4 | 10 | 1 | 10^{-1} | 10^{-2} |
| Decimetru | dm | 10^8 | 10^5 | 10^2 | 10 | 1 | 10^{-1} |
| Metru | m | 10^9 | 10^6 | 10^3 | 10^2 | 10 | 1 |

2. Masă

| Denumire | Simbol | fg | pg | ng | μg | mg | g | kg |
|---------------------|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|---------------|------------|------------|------------|
| Femtogram | fg | 1 | 10^{-3} | 10^{-6} | 10^{-9} | 10^{-12} | 10^{-15} | 10^{-18} |
| Picogram | pg | 10^3 | 1 | 10^{-3} | 10^{-6} | 10^{-9} | 10^{-12} | 10^{-15} |
| Nanogram | ng | 10^6 | 10^3 | 1 | 10^{-3} | 10^{-6} | 10^{-9} | 10^{-12} |
| Microgram (gama) | μg (γ) | 10^9 | 10^6 | 10^3 | 1 | 10^{-3} | 10^{-6} | 10^{-9} |
| Miligram | mg | 10^{12} | 10^9 | 10^6 | 10^3 | 1 | 10^{-3} | 10^{-6} |
| Gram | g | 10^{15} | 10^{12} | 10^9 | 10^6 | 10^3 | 1 | 10^{-3} |
| Kilogram | kg | 10^{18} | 10^{15} | 10^{12} | 10^9 | 10^6 | 10^3 | 1 |

3. Volum

| Denumire | Simbol | μl | ml | l |
|-----------------------------------|---------------|---------------|-----------|-----------|
| Microlitru ($=1\text{mm}^3$) | μl | 1 | 10^{-3} | 10^{-6} |
| Mililitru (1cm^3) | ml | 10^3 | 1 | 10^{-3} |
| Decilitru ($0,1\text{dm}^3$) | dl | 10^5 | 10^2 | 10^{-1} |
| Litru (1dm^3) | l | 10^6 | 10^3 | 1 |

AMESTECURI RĂCITOARE

| Nr. crt. | Componente | Raportul (în greutate) | Temperatura amestecului (°C) |
|----------|---|------------------------|------------------------------|
| 1 | Apă la 15°C – NH ₄ Cl | 10:3 | 0 |
| 2 | Apă – CaCl ₂ ·7H ₂ O | 2:5 | -12 |
| 3 | Apă la 13,2°C – NaNO ₃ | 7,5:10 | -5,3 |
| 4 | Apă – Na ₂ CO ₃ ·10H ₂ O – NH ₄ NO ₃ | 1:1:1 | -22 |
| 5 | Gheață – NaCl | 3:1 | -21 |
| 6 | Gheață – KCl | 10:3 | -11 |
| 7 | Gheață – KCl | 1:1 | -30 |
| 8 | Gheață – NH ₄ Cl | 4:1 | -15 |
| 9 | Gheață – NaCl - NH ₄ Cl | 5:2:1 | -25 |
| 10 | Gheață – CaCl ₂ ·6H ₂ O | 3:5 | -39 |
| | | 2:3 | -49 |
| | | 7:10 | -55 |
| 11 | Gheață – etanol | 73:77 | -30 |
| 12 | Gheață – soluție H ₂ SO ₄ 65,5% | 1:1 | -37 |
| 13 | HCl conc. – Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O | 21:80 | -25 |
| | | 10:16 | -22 |
| 14 | CO ₂ solid – etanol | -- | -72 |
| 15 | CO ₂ solid – acetona | -- | -86 |
| 16 | CO ₂ solid – cloroform | -- | -77 |
| 17 | CO ₂ solid – dietil eter | -- | -90 |

ANEXA NR.7

Indicatori acido-bazici

| Nr. crt. | Denumire uzuală | Denumire chimică | Domeniul de viraj (pH) | Schimbarea culorii cu creșterea valorii pH | | Soluția de indicator | |
|----------|------------------------|--|------------------------|--|-------------------|----------------------|-------------------|
| | | | | formă acidă | formă bazică | conc. % | solventul folosit |
| 1 | Roșu de crezol | o-crezol-sulfoftaleină | 0,2-1,8 | roșu | galben | 0,1 | Etanol 20% |
| | | | 7,2-8,8 | galben | roșu | | |
| 2 | Albastru de timol | Timol-sulfoftaleină | 1,2-2,8 | roșu | galben | 0,1 | Etanol 20% |
| | | | 8,0-9,6 | galben | albastru | | |
| 3 | Tropeolin 00 | Acid difenilamino-azobenzen-p-sulfonic | 1,4-2,6 | roșu | galben | 1,0 | Apă distilată |
| 4 | Albastru de bromfenol | Tetrabromfenol- sulfoftaleină | 3,0-4,6 | galben | albastru (violet) | 0,1 | Apă distilată |
| 5 | Roșu de Congo | Acid bifenil-4,4'-(2-azo-1-naftilamino-4-sulfonic) | 3,0-5,0 | albastru | roșu | 0,1 | Apă distilată |
| 6 | Metiloranj | Dimetilamino-azobenzen-p-sulfonat de sodiu | 3,1-4,4 | roșu | galben | 0,1 | Apă distilată |
| 7 | Albastru de bromcrezol | | 4,0-5,6 | galben | albastru | 0,1 | Etanol 20% |
| 8 | Roșu de metil | Acid p-dimetilamino-azobenzen-o-carboxilic | 4,2-6,3 | roșu | galben | 0,2 | Etanol 60% |
| 9 | Albastru de bromtimol | Dibromtimol- sulfoftaleină | 6,0-7,6 | galben | albastru | 0,1 | Etanol 20% |
| 10 | Roșu de fenol | Fenol- sulfoftaleină | 6,8-8,4 | galben | roșu | 0,1 | Etanol 20% |
| 11 | Tropeolin 000 | Acid α -naftol-azobenzen-p-sulfonic | 7,6-8,9 | galben | roșu | 0,1 | Apă distilată |
| 12 | Fenofaleină | Di-p-hidroxifenil-ftalidă | 8,3-10,0 | incolor | roșu | 1,0 | Etanol 60% |
| 13 | Timolftaleină | Ditimol-ftalidă | 9,3-10,6 | incolor | albastru | 0,1 | Etanol |
| 14 | Tropeolin 0 | Acid rezorcin-azobenzen-p-sulfonic | 11,1-12,7 | galben | oranj | 0,1 | Apă distilată |

SOLUȚII TAMPON

1) Tampon fosfat după Sørensen 66,7mM (isotonic)

A. Soluție de fosfat monopotasic 66,7mM: 9,08g KH_2PO_4 uscat în prealabil o oră la 110°C se dizolvă în apă distilată lipsită de CO_2 , într-un balon cotat de 1000ml și se completează la semn cu același solvent.

B. Soluție de fosfat disodic 66,7mM: 9,479g Na_2HPO_4 anhidru, încălzit în prealabil 1-2 ore la 110°C , se dizolvă în apă distilată lipsită de CO_2 și se completează la 1000ml, într-un balon cotat.

Pentru obținerea unei soluții tampon la o valoare pH dorită, pe domeniul 5,0-8,2, se amestecă volumul din soluțiile A și B în proporțiile corespunzătoare, menționate în tabel.

| pH | A (ml) | B (ml) | pH | A (ml) | B (ml) |
|-----|--------|--------|-----|--------|--------|
| 5,0 | 98,8 | 1,2 | 6,8 | 50,8 | 49,2 |
| 5,2 | 98,0 | 2,0 | 7,0 | 39,2 | 60,8 |
| 5,4 | 96,7 | 3,3 | 7,2 | 28,5 | 71,5 |
| 5,6 | 94,8 | 5,2 | 7,4 | 19,6 | 80,4 |
| 5,8 | 91,9 | 8,1 | 7,6 | 13,2 | 86,8 |
| 6,0 | 87,7 | 12,3 | 7,8 | 8,6 | 91,4 |
| 6,2 | 81,5 | 18,5 | 8,0 | 5,5 | 94,5 |
| 6,4 | 73,2 | 26,8 | 8,2 | 3,3 | 96,7 |
| 6,6 | 62,7 | 37,3 | -- | -- | -- |

2) Tampon fosfat pH = 5,7-8,0

A. Soluție fosfat monosodic 0,2M: 27,6g fosfat monosodic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) se dizolvă în apă distilată, într-un balon cotat de 1000ml și apoi se completează la semn cu apă distilată.

B. Soluție fosfat disodic 0,2M: 28,39g fosfat disodic anhidru (Na_2HPO_4) sau 53,62g fosfat disodic cristalizat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) se dizolvă în apă distilată, într-un balon cotat de 1000ml și se completează la semn, tot cu apă distilată.

Pentru a obține soluția tampon cu un pH dorit, se amestecă volume din soluțiile A și B conform tabelului de mai jos.

| pH | A (ml) | B (ml) | pH | A (ml) | B (ml) |
|-----|--------|--------|-----|--------|--------|
| 5,7 | 93,5 | 6,5 | 6,9 | 45,0 | 55,0 |
| 5,8 | 92,0 | 8,0 | 7,0 | 39,0 | 61,0 |
| 5,9 | 90,0 | 10,0 | 7,1 | 33,0 | 67,0 |
| 6,0 | 87,7 | 12,3 | 7,2 | 28,0 | 72,0 |
| 6,1 | 85,0 | 15,0 | 7,3 | 23,0 | 77,0 |
| 6,2 | 81,5 | 18,5 | 7,4 | 19,0 | 81,0 |
| 6,3 | 77,5 | 22,5 | 7,5 | 16,0 | 84,0 |
| 6,4 | 73,5 | 26,5 | 7,6 | 13,0 | 87,0 |
| 6,5 | 68,5 | 31,5 | 7,7 | 10,5 | 90,5 |
| 6,6 | 62,5 | 37,5 | 7,8 | 8,5 | 91,5 |
| 6,7 | 56,5 | 43,5 | 7,9 | 7,0 | 93,0 |
| 6,8 | 51,0 | 49,0 | 8,0 | 5,3 | 94,7 |

3) Tampon acid acetic-acetat de sodiu, pH=3,6-5,6

A. Soluție de acid acetic 0,2M: 11,55ml acid acetic glacial se introduce într-un balon cotat de 1000ml și se completează la semn cu apă distilată.

B. Soluție de acetat de sodiu 0,2M: 16,41g acetat de sodiu anhidru (CH_3COONa) sau 27,22g acetat de sodiu cristalizat ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) se dizolvă în apă distilată și se completează la un volum total de 1000ml cu apă distilată.

Pentru obținerea unei soluții tampon cu un anumit pH, se amestecă din soluțiile A și B volumele menționate în tabelul de mai jos și se completează cu apă distilată la un volum total de 100ml.

| pH | A (ml) | B (ml) | pH | A (ml) | B (ml) |
|-----|--------|--------|-----|--------|--------|
| 3,6 | 46,3 | 3,7 | 4,8 | 20,0 | 30,0 |
| 3,8 | 44,0 | 6,0 | 5,0 | 14,8 | 35,2 |
| 4,0 | 41,0 | 9,0 | 5,2 | 10,5 | 39,5 |
| 4,2 | 36,8 | 13,2 | 5,4 | 8,8 | 41,2 |
| 4,4 | 30,5 | 19,5 | 5,6 | 4,8 | 45,2 |
| 4,6 | 25,5 | 24,5 | | | |

4) Tampon $\text{CH}_3\text{COONa}\text{-HCl}$ (tampon Walpone) pH=0,65-5,2

A. Soluție 0,1M acetat de sodiu: 82,04g acetat de sodiu anhidru (CH_3COONa) se dizolvă într-o cantitate corespunzătoare de apă distilată și se completează cu exactitate la un volum total de 1000ml, într-un balon cotat, cu apă distilată.

B. Acid clorhidric 1M, verificat (prin titrare).

Pentru obținerea unei astfel de soluții, cu un anumit pH, se amestecă 100ml soluție A, cu volumul corespunzător din soluția B, trecut în tabelul de mai jos, și se completează cu apă distilată până la 500ml, într-un balon cotat.

| pH | A (ml) | B (ml) | Apă distilată (ml) | pH | A (ml) | B (ml) | Apă distilată (ml) |
|------|--------|--------|--------------------|------|--------|--------|--------------------|
| 0,65 | 100 | 200 | 200 | 3,29 | 100 | 95,0 | 305,0 |
| 0,91 | 100 | 160 | 240 | 3,50 | 100 | 92,5 | 307,5 |
| 1,09 | 100 | 140 | 260 | 3,79 | 100 | 85,0 | 315,0 |
| 1,24 | 100 | 130 | 270 | 3,95 | 100 | 80,0 | 320,0 |
| 1,42 | 100 | 120 | 280 | 4,19 | 100 | 70,0 | 330,0 |
| 1,71 | 100 | 110 | 290 | 4,58 | 100 | 50,0 | 350,0 |
| 1,99 | 100 | 105 | 295 | 4,76 | 100 | 40,0 | 360,0 |
| 2,32 | 100 | 102 | 298 | 4,92 | 100 | 30,0 | 370,0 |
| 2,72 | 100 | 99,5 | 300,5 | 5,20 | 100 | 20,0 | 380,0 |
| 3,09 | 100 | 97,0 | 303,0 | -- | -- | -- | -- |

5) Tampon carbonat de sodiu-bicarbonat, pH=9,2-10,7

A.Soluție carbonat de sodiu 0,2M: 21,2g carbonat de sodiu anhidru (Na_2CO_3) introduse într-un balon cotat de 1000ml se dizolvă într-o cantitate convenabilă de apă distilată și se completează la semn cu același solvent.

B.Soluție de bicarbonat de sodiu 0,2M: 16,8g bicarbonat de sodiu pur (NaHCO_3) conținute într-un balon cotat de 1000ml, se dizolvă în apă bidistilată și se completează la semn, cu apă bidistilată.

Pentru obținerea oricărei soluții cu un pH dorit, se amestecă soluțiile A și B în volumele corespunzătoare menționate în tabelul de mai jos și se diluează cu apă distilată până la un volum total de 200ml.

| pH | A (ml) | B (ml) | pH | A (ml) | B (ml) |
|-----|--------|--------|------|--------|--------|
| 9,2 | 4,0 | 46,0 | 10,0 | 27,5 | 22,5 |
| 9,3 | 7,5 | 42,5 | 10,1 | 30,0 | 20,0 |
| 9,4 | 9,5 | 40,5 | 10,2 | 33,0 | 17,0 |
| 9,5 | 13,0 | 37,0 | 10,3 | 35,5 | 14,5 |
| 9,6 | 16,0 | 34,0 | 10,4 | 38,5 | 11,5 |
| 9,7 | 19,5 | 30,5 | 10,5 | 40,5 | 9,5 |
| 9,8 | 22,0 | 28,0 | 10,6 | 42,5 | 7,5 |
| 9,9 | 25,0 | 25,0 | 10,7 | 45,0 | 5,0 |

6) Tampon glicocol-NaOH, pH=8,6-10,6

A. Soluție de glicocol 0,2M: 15,01g glicocol pur se dizolvă într-un balon cotat de 1000ml, într-un volum convenabil de apă distilată și se completează la semn cu apă distilată.

B. Soluție de hidroxid de sodiu 0,2M: 8g NaOH conținut într-un balon cotat de 1000ml se dizolvă și se completează apoi la semn, cu apă distilată.

Pentru obținerea oricărei soluții corespunzând unei valori pH din domeniul precizat, se realizează amestecurile din soluțiile A, B și apă distilată, cuprinse în tabelul următor.

| pH | A (ml) | B (ml) | Apă distilată (ml) | pH | A (ml) | B (ml) | Apă distilată (ml) |
|-----|--------|--------|--------------------|------|--------|--------|--------------------|
| 8,6 | 50,0 | 4,0 | 146,0 | 9,8 | 50,0 | 27,2 | 122,8 |
| 8,8 | 50,0 | 6,0 | 144,0 | 10,0 | 50,0 | 32,0 | 118,0 |
| 9,0 | 50,0 | 8,8 | 141,2 | 10,2 | 50,0 | 38,6 | 111,4 |
| 9,2 | 50,0 | 12,0 | 138,0 | 10,4 | 50,0 | 42,6 | 107,4 |
| 9,4 | 50,0 | 16,8 | 133,2 | 10,6 | 50,0 | 45,5 | 104,5 |
| 9,6 | 50,0 | 22,4 | 127,6 | -- | -- | -- | -- |

7) Tampon glicocol-HCl, pH=2,2-3,6 (la 25°C)

A. Soluție de glicocol 0,2M: 15,01g glicocol se dizolvă într-o cantitate convenabilă de apă distilată, conținută într-un balon cotat de 1000ml și se aduce la semn cu apă distilată.

B. Soluție de acid clorhidric 0,2M, preparată după metode uzuale.

Pentru obținerea soluțiilor având valorile pH dorite, se amestecă cantitățile din soluțiile A și B, adăugându-se apă distilată până la un volum total al soluției, de 200ml, la balon cotat.

| pH | A (ml) | B (ml) | Apă distilată (ml) | pH | A (ml) | B (ml) | Apă distilată (ml) |
|-----|--------|--------|--------------------|-----|--------|--------|--------------------|
| 2,2 | 50,0 | 44,0 | 106,0 | 3,0 | 50,0 | 11,4 | 138,6 |
| 2,4 | 50,0 | 32,4 | 117,6 | 3,2 | 50,0 | 8,2 | 141,8 |
| 2,6 | 50,0 | 24,2 | 125,8 | 3,4 | 50,0 | 6,4 | 143,6 |
| 2,8 | 50,0 | 16,8 | 133,2 | 3,6 | 50,0 | 5,0 | 145,0 |

8) Tampon glicocol-NaOH-NaCl, pH=8,4-12,8 (la 25°C)

A. Soluție glicocol și NaCl 0,1M, raportată la ambele substanțe: 7,505g glicocol și 5,85g NaCl, ambele în stare pură, se introduc într-un balon cotat de 1000ml și se completează la semn cu apă distilată, agitând până la dizolvare completă.

B. Soluție NaOH 0,1M: 0,4g NaOH se dizolvă într-o cantitate convenabilă de apă distilată, într-un balon cotat de de 1000ml și se completează la semn, cu apă distilată.

Pentru a se obține soluții tampon cu un pH dorit, se amestecă volume din soluțiile A și B în proporțiile menționate în tabelul de mai jos.

| pH | A (ml) | B (ml) | pH | A (ml) | B (ml) |
|------|--------|--------|------|--------|--------|
| 8,4 | 95,0 | 5,0 | 11,1 | 50,0 | 50,0 |
| 8,7 | 90,0 | 10,0 | 11,4 | 49,0 | 51,0 |
| 9,1 | 80,0 | 20,0 | 11,8 | 45,0 | 55,0 |
| 9,5 | 70,0 | 30,0 | 12,2 | 40,0 | 60,0 |
| 9,9 | 60,0 | 40,0 | 12,4 | 30,0 | 70,0 |
| 10,3 | 55,0 | 45,0 | 12,6 | 20,0 | 80,0 |
| 10,8 | 51,0 | 49,0 | 12,8 | 10,0 | 90,0 |

9) Tampon acid citric-fosfat disodic, pH=2,6-7,0

A. Soluție de acid citric 0,1M: 19,21g acid citric se dizolvă în apă distilată și se completează la 1000ml cu același solvent.

B. Soluție de fosfat disodic 0,2M: 53,65g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sau 71,7g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ se dizolvă în apă distilată și se completează la un volum total de 1000ml cu apă distilată.

Pentru obținerea soluțiilor tampon cu pH dorit se amestecă soluțiile A, B și apă distilată, conform tabelului de mai jos.

| pH | A (ml) | B (ml) | Apă distilată (ml) | pH | A (ml) | B (ml) | Apă distilată (ml) |
|-----|--------|--------|--------------------|-----|--------|--------|--------------------|
| 2,6 | 44,6 | 5,4 | 50 | 5,0 | 24,3 | 25,7 | 50 |
| 2,8 | 42,2 | 7,8 | 50 | 5,2 | 23,3 | 26,7 | 50 |
| 3,0 | 39,8 | 10,2 | 50 | 5,4 | 22,2 | 27,8 | 50 |
| 3,2 | 37,7 | 12,3 | 50 | 5,6 | 21,0 | 29,0 | 50 |
| 3,4 | 35,9 | 14,1 | 50 | 5,8 | 19,7 | 30,3 | 50 |
| 3,6 | 33,9 | 16,1 | 50 | 6,0 | 17,9 | 32,1 | 50 |
| 3,8 | 32,3 | 17,7 | 50 | 6,2 | 16,9 | 33,1 | 50 |
| 4,0 | 30,7 | 19,3 | 50 | 6,4 | 15,4 | 34,6 | 50 |
| 4,2 | 29,4 | 20,6 | 50 | 6,6 | 13,6 | 36,4 | 50 |
| 4,4 | 27,8 | 22,2 | 50 | 6,8 | 9,1 | 40,9 | 50 |
| 4,6 | 26,7 | 23,3 | 50 | 7,0 | 6,5 | 43,5 | 50 |
| 4,8 | 25,2 | 24,8 | 50 | -- | -- | -- | -- |

10) Tampon acid citric-citrat de sodiu 0,05M, pH=3,0-6,2

A. 21,02g (0,1M) acid citric monohidrat se dizolvă și se aduce la semn cu apă distilată, într-un balon cotat de 1000ml, la 23°C.

B. 29,41g (0,1M) citrat trisodic dihidrat se dizolvă în apă bidistilată, într-un balon cotat de 1000ml și se aduce la semn cu același solvent, la 23°C.

Pentru obținerea soluțiilor cu un anumit pH, se amestecă volumele corespunzătoare din soluțiile A și B, din tabelul de mai jos, într-un balon cotate de 100ml și se aduce la semn, cu apă distilată.

| pH | A (ml) | B (ml) | Apă distilată (ml) | pH | A (ml) | B (ml) | Apă distilată (ml) |
|-----|--------|--------|--------------------|-----|--------|--------|--------------------|
| 3,0 | 46,5 | 3,5 | 50,0 | 4,6 | 25,5 | 24,5 | 50,0 |
| 3,2 | 43,7 | 6,3 | 50,0 | 4,8 | 23,0 | 27,0 | 50,0 |
| 3,4 | 40,0 | 10,0 | 50,0 | 5,0 | 20,5 | 29,5 | 50,0 |
| 3,6 | 37,0 | 13,0 | 50,0 | 5,2 | 18,0 | 32,0 | 50,0 |
| 3,8 | 35,0 | 15,0 | 50,0 | 5,4 | 16,0 | 34,0 | 50,0 |
| 4,0 | 33,0 | 17,0 | 50,0 | 5,6 | 13,7 | 36,3 | 50,0 |
| 4,2 | 31,5 | 18,5 | 50,0 | 5,8 | 11,8 | 38,2 | 50,0 |
| 4,4 | 28,0 | 22,0 | 50,0 | 6,0 | 9,5 | 40,5 | 50,0 |
| -- | -- | -- | -- | 6,2 | 7,2 | 42,8 | 50,0 |

11) Tampon acid boric-borax, pH=7,6-9,2

A.Soluție 0,2M acid boric: 12,36g acid boric se dizolvă în apă bidistilată, într-un balon cotate de 1000ml și se completează la semn cu același solvent.

B.Soluție de borax (tetraborat de sodiu $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 0,05M: 19,07g borax se dizolvă în apă bidistilată și se completează la 1000ml, cu apă bidistilată, într-un balon cotate.

Soluțiile tampon cu pH dorit, se realizează amestecând într-un balon cotate 50ml soluție A cu volumele corespunzătoare din soluția B și apă bidistilată, până la 200ml, conform tabelului de mai jos.

| pH | A (ml) | B (ml) | Apă distilată (ml) | pH | A (ml) | B (ml) | Apă distilată (ml) |
|-----|--------|--------|--------------------|-----|--------|--------|--------------------|
| 7,6 | 50,0 | 2,0 | 148,0 | 8,7 | 50,0 | 22,5 | 127,5 |
| 7,8 | 50,0 | 3,1 | 146,9 | 8,8 | 50,0 | 30,0 | 120,0 |
| 8,0 | 50,0 | 4,9 | 145,1 | 8,9 | 50,0 | 42,5 | 107,5 |
| 8,2 | 50,0 | 7,3 | 142,7 | 9,0 | 50,0 | 59,0 | 91,0 |
| 8,4 | 50,0 | 11,5 | 138,5 | 9,1 | 50,0 | 83,0 | 67,0 |
| 8,6 | 50,0 | 17,5 | 132,5 | 9,2 | 50,0 | 115,0 | 35,0 |

12) Tampon borax-hidroxid de sodiu, pH=9,28-10,1

A.Soluție de borax 0,05M: 19,05g borax se dizolvă în apă distilată și se completează până la 1000ml.

B.Soluție de hidroxid de sodiu 0,2M: 8g NaOH se dizolvă în apă distilată și se completează până la un volum total de 1000ml.

Soluțiile tampon cu pH pe intervalul menționat se obțin luând în amestec soluțiile A, B și apă distilată, conform tabelului de mai jos.

| pH | A (ml) | B (ml) | Apă distilată (ml) | pH | A (ml) | B (ml) | Apă distilată (ml) |
|------|--------|--------|--------------------|------|--------|--------|--------------------|
| 9,28 | 50 | 0,0 | 150,0 | 9,7 | 50 | 29,0 | 121,0 |
| 9,35 | 50 | 7,0 | 143,0 | 9,8 | 50 | 34,0 | 116,0 |
| 9,40 | 50 | 11,0 | 139,0 | 9,9 | 50 | 38,6 | 111,4 |
| 9,50 | 50 | 17,6 | 132,4 | 10,0 | 50 | 43,0 | 107,0 |
| 9,60 | 50 | 23,0 | 127,0 | 10,1 | 50 | 46,0 | 104,0 |

13) Tampon TRIS-HCl, pH=7,2-9,0

A. Soluție TRIS 0,2M: 24,2g TRIS*) se solubilizează în apă bidistilată într-un balon cotel de 1000ml și se completează la semn.

B. Soluție HCl 0,2M: preparată după metode uzuale.

Pentru obținerea soluțiilor tampon cu pH dorit, se amestecă 50ml soluție A, cu volumele corespunzătoare din soluția B și apă bidistilată, cuprinse în tabelul de mai jos.

| pH | A (ml) | B (ml) | Apă distilată (ml) | pH | A (ml) | B (ml) | Apă distilată (ml) |
|-----|--------|--------|--------------------|-----|--------|--------|--------------------|
| 7,2 | 50,0 | 44,2 | 105,8 | 8,2 | 50,0 | 21,9 | 128,1 |
| 7,4 | 50,0 | 41,4 | 108,6 | 8,4 | 50,0 | 16,5 | 133,5 |
| 7,6 | 50,0 | 38,4 | 111,6 | 8,6 | 50,0 | 12,2 | 137,8 |
| 7,8 | 50,0 | 32,5 | 117,5 | 8,8 | 50,0 | 8,1 | 141,9 |
| 8,0 | 50,0 | 26,8 | 123,2 | 9,0 | 50,0 | 5,0 | 145,0 |

*Trihidroximetilaminometan (HOCH₂)₃C-NH₂

14) Tampon TRIS-acid maleic, pH=5,08-8,45

A. Soluție de acid maleic 0,1M: 116g acid maleic se dizolvă în apă distilată și se completează la 1000ml, într-un balon cotel.

B. Soluție trihidroximetilaminometan 0,1M: 121g trihidroximetilaminometan se dizolvă în apă distilată, într-un balon cotel de 1000ml și se completează la semn, cu apă distilată.

C. Soluție de NaOH 0,5M: 20g NaOH se dizolvă într-o cantitate convenabilă de apă și se completează la 1000ml, într-un balon cotel.

Pentru obținerea soluțiilor tampon cu pH dorit se amestecă soluțiile A, B, C și apă distilată, conform raportului volumetric din tabelul care urmează.

| pH | A (ml) | B (ml) | C (ml) | Apă distilată (ml) | pH | A (ml) | B (ml) | C (ml) | Apă distilată (ml) |
|------|--------|--------|--------|--------------------|------|--------|--------|--------|--------------------|
| 5,08 | 5 | 5 | 1 | 39 | 6,86 | 5 | 5 | 9 | 31 |
| 5,30 | 5 | 5 | 2 | 38 | 7,20 | 5 | 5 | 10 | 30 |
| 5,52 | 5 | 5 | 3 | 37 | 7,50 | 5 | 5 | 11 | 29 |
| 5,70 | 5 | 5 | 4 | 36 | 7,75 | 5 | 5 | 12 | 28 |
| 5,88 | 5 | 5 | 5 | 35 | 7,97 | 5 | 5 | 13 | 27 |
| 6,05 | 5 | 5 | 6 | 34 | 8,15 | 5 | 5 | 14 | 26 |
| 6,27 | 5 | 5 | 7 | 33 | 8,30 | 5 | 5 | 15 | 25 |
| 6,50 | 5 | 5 | 8 | 32 | 8,45 | 5 | 5 | 16 | 24 |

15) Tampon veronal-veronal sodic^{*)}, pH=7,0-8,9

A. Soluție veronal (acid dietilbarbituric) 0,04M: 7,36g veronal se dizolvă în apă bidistilată la cald și apoi se completează la 1000ml.

B. Soluție veronal sodic (dietilbarbiturat de sodiu) 0,04M: 8,24g veronal sodic se dizolvă în apă bidistilată și se completează la un volum total al soluției de 1000ml.

Pentru prepararea soluțiilor tampon cu valori pH pe domeniul indicat se amestecă A și B în proporțiile corespunzătoare din tabelul următor.

| pH | A (ml) | B (ml) | pH | A (ml) | B (ml) |
|-----|--------|--------|-----|--------|--------|
| 7,0 | 90,0 | 10,0 | 8,0 | 50,0 | 50,0 |
| 7,1 | 87,5 | 12,5 | 8,1 | 42,5 | 57,5 |
| 7,2 | 84,5 | 15,5 | 8,2 | 35,0 | 65,0 |
| 7,3 | 81,0 | 19,0 | 8,3 | 28,0 | 72,0 |
| 7,4 | 77,5 | 22,5 | 8,4 | 23,5 | 76,5 |
| 7,5 | 74,0 | 26,0 | 8,5 | 20,0 | 80,0 |
| 7,6 | 70,0 | 30,0 | 8,6 | 17,0 | 83,0 |
| 7,7 | 65,5 | 34,5 | 8,7 | 14,5 | 85,5 |
| 7,8 | 60,5 | 39,5 | 8,8 | 12,0 | 88,0 |
| 7,9 | 55,5 | 44,5 | 8,9 | 10,0 | 90,0 |

^{*)}Valorile pH din tabel corespund pentru temperatura de 25°C. Pentru determinarea valorilor pH la 37°C, se scad 0,1 unități.

16) Tampon ftalat-acid clorhidric, pH=2,2-3,8

A. Soluție ftalat acid de potasiu 0,2M: 40,85g ftalat acid de potasiu se dizolvă în apă distilată și se aduce la un volum final de 1000ml.

B. Soluție de acid clorhidric 0,2M: preparat după metode uzuale.

Se amestecă soluțiile A și B în volumele indicate în tabel și se completează la 200ml cu apă distilată.

| pH | A (ml) | B (ml) | pH | A (ml) | B (ml) |
|-----|--------|--------|-----|--------|--------|
| 2,2 | 50,0 | 46,7 | 3,2 | 50,0 | 14,7 |
| 2,4 | 50,0 | 39,6 | 3,4 | 50,0 | 9,9 |
| 2,6 | 50,0 | 33,0 | 3,6 | 50,0 | 6,0 |
| 3,0 | 50,0 | 20,3 | 3,8 | 50,0 | 2,6 |

BIBLIOGRAFIE

1. Affinity Chromatography. Principles and Methods, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden, 1976
2. Albert, F.; Ianu, A. și Mărculețiu, V., Tabele chimice în Chimia analitică, Ed. Tehnică, București, 1965
3. Avrameas, S. și Ternyck, T., J. Biol. Chem. 242, 1967, pag. 651
4. Brenner, M.; Sailer, E. și Kochen, V., Helv. Chim. Acta 31, 1948, pag. 1908
5. Brenner, M.; Müller, H. R. și Pfister, R. W., Helv. Chim. Acta 33, 1950, pag. 568
6. Brenner, M. și Kocher, V., Helv. Chim. Acta 32, 1949, pag. 333
7. Broun, G.; Avrameas, S.; Sélegny, E. și Thomas, D., Biochim. Biophys. Acta 185, 1969, pag. 260
8. Capitole speciale de Chimie Organică. Lucrări practice. Coordonator, A. Gioabă, Ed. Universității din București, 1994
9. Câmpeanu, G.; Șerban, M. și Ionescu, E., Metode de laborator în biochimia animală, Ed. Didactică și Pedagogică, R. A., București, 1993
10. Ceaușescu, S.; Turcu, A.; Mihăescu, A. și Petrovanu, V., Lucrări practice de Biochimie generală, Univ. din București, 1981
11. Chibata, I. și Wingard Jr., L. B., Applied Biochemistry and Bioengineering. Immobilized microbial Cell, Acad. Press New York 1983, vol. 4
12. Farmacopeea Română, vol. 10
13. Gioabă, A., Lucrări practice de Biochimie. Inst. Politehnic București, 1986
14. Glassmeyer, C. K. și Ogle, I. D., Biochemistry 10, 1971, pag. 786
15. Gozia, O.; Ciopraga, J. și Schell, H. D., Studii și cercetări de Biochimie, Ed. Academiei Române, 33 (2), 1990, pag. 95
16. Hartmeier, W., Immobilisierte Biokatalysatoren (Eine Einführung). Springer – Verlag Berlin, 1986
17. Hayashi, Y. și Lawson, W. B., J. Biol. Chem. 244, 1969, pag. 4158
18. Ifrim, S. și Roșca, I., Chimie generală, Ed. Tehnică, București, 1989
19. Iordăchescu, D. și Dumitru, I. F., Biochimie practică. Proteine și enzime. Partea I, Univ. din București, 1980
20. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 7, North Holland Publishing Company, 1979
21. Kay, G.; Lilly, M.D.; Sharp, A. K. și Wilson, R. J. H., Nature (London) 217, 1968, pag. 641
22. Kay, G. și Lilly, M. D., Biochim. Biophys. Acta 198, 1970, pag. 276
23. Maier, O.; Schell, H. D.; Petrescu, A. D.; Enache, I. și Benția, T., Rev. roum. Biochim. 23, 1986, pag. 37

24.Manta, I.; Cucuianu, M.; Benga, G. și Hodârnău, A., Metode biochimice în laboratorul chimic, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1976

25.Methods in Enzymology, vol. XLIV (Immobilized Enzymes). Ed. K.Mosbach Academic Press, New york, 1976

26.Mihele, D. și Pavlovici, M., Biochimie clinică. Metode de laborator, Ed. Medicală, București, 1996

27.Noelting, G. și Bernfeld, P., Helv. Chim. Acta 31, 1948, pag. 268

28.Pătroescu, I. și colab., Lucrări practice de Chimie analitică și analiză instrumentală, vol. I, partea aIIa, Inst. Politehnic București, 1988

29.Popa, E., Biocatalizatori imobilizați, vol. I, Ed. Universității din București, 1996

30.Popa, E., Biocatalizatori imobilizați, vol. II, Ed. Universității din București, 1997

31.Schell, H. D.; Enache, E. și Petrescu, A. D., Studii și cercetări de Biochimie 31, 1, 1988, pag. 73, Ed. Acad. RSR

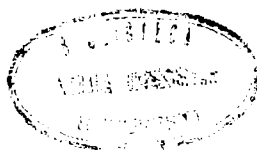
32.Siegmund, P.; Schütte, E. și Körber, F., Practicum der Physiologischen Chemie, Walter de Gruyter and Co, Berlin, 1968

33.The Condensed Chemical Dictionary, Eigt Ed., Rev. by Gessner G. Hawley, van Nostrand Reinhold Comp., 1971

34.Thomas, D.; Brown, G. și Sélegny, E., Biochimie 54, 1972, pag. 229

35.Vieth, W. R.; wang, S.S. și Gilbert, S. G., Biotechnol. Bioenerg. Symp. 3, 1972, pag. 285

36.WISSENSHATLICHE TABELLEN, 1968, 1973, Herausgeber: CIBA-GEIGY AG, BASEL



**Tiparul s-a executat sub c-da nr. 532/1999,
la Tipografia Editurii Universității din București**

ISBN: 973 - 575 - 307 - 3

Lei 17000