

**UNIVERSITATEA BABES-BOLYAI CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE CHIMIE SI INGINERIE CHIMICA  
CATEDRA DE CHIMIE FIZICA**

**MEMBRANE CU ENZIME IMOBILIZATE**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**Conducator stiintific:  
Dr. chimist GEORGETA POPESCU**

**Doctorand:  
Ing. BATRINESCU GHEORGHE**

**2003**

## INTRODUCERE

Biocataliza enzimatica se aplica frecvent in diverse domenii de activitate: industria alimentara, chimico-farmaceutica, medicina umana si veterinara, in cercetare pentru explicarea unor procese biochimice esentiale si altele.

In majoritatea proceselor in care intervine biocataliza enzimatica se utilizeaza enzime solubile si ca urmare procesele de acest fel decurg discontinuu. La sfarsitul procesului, catalizatorul introdus (enzima solubila) nu mai poate fi recuperat, in plus aparand necesitatea ca in aceasta faza enzima solubila sa fie inactivata. Apare astfel o diferenta fata de cataliza clasica in care un catalizator este utilizat de "n" ori, pana la epuizarea acestuia.

Inconveniente care apar la utilizarea enzimelor solubile au fost inlaturate odata cu obtinerea si aplicarea in practica a enzimelor imobilizate, care se apropie ca mod de utilizare de catalizatorii clasici.

Enzimele imobilizate au deschis noi perspective in domeniul proceselor in care intervin biocatalizatori enzimatici, facand posibila desfasurarea acestora in sistem continuu, tratarea in conditii optime a unor solutii diluate, disparitia enzimei din mediul rezultat dupa transformare si evitarea formarii de produse secundare nedorite.

Prin imobilizarea enzimelor s-a reusit nu numai pastrarea caracteristicilor biocatalizatorilor supusi imobilizarii, ci in foarte multe cazuri s-a ajuns la o imbunatatire substantiala a acestora. Astfel:

a) cu o enzima imobilizata se poate lucra la o temperatura mai mare comparativ cu temperatura la care se lucreaza cu aceeaasi enzima neimobilizata; aceasta se datoreste faptului ca substratul pe care este imobilizata enzima joaca un rol protector in procesul de inactivare termica a enzimei;

b) datorita aceluiasi efect protector al substratului utilizat la imobilizare, s-a constatat o crestere a stabilitatii in timp a enzimelor imobilizate fata de cele neimobilizate;

c) prin imobilizare, in functie de metoda adoptata se pot obtine, pornind de la aceeaasi enzima, preparate imobilizate care actioneaza optim la valori diferite ale pH-ului; exista astfel posibilitatea selectarii unei metode de obtinere a unei enzime imobilizate care sa actioneze la un pH dorit, impus de natura substratului care trebuie transformat, de natura produsului care trebuie obtinut si nu in ultimul rand de natura materialelor utilizate la constructia utilajelor.

Membranele si procesele de membrana ocupa in prezent un loc important in marea majoritate a tehnologiilor moderne. Interesul manifestat de stiinta membranelor este motivat de aspecte privind fenomenele de transport, curgerea in medii poroase, separarea mediilor in conditii ecologice si la temperatura mediului ambiant, precum si de multitudinea de aplicatii practice. Dintre acestea, in ultimul timp s-au impus utilizarile membranelor si proceselor de membrana in domeniul biotehnologiilor, cu precadere pentru imobilizarea enzimelor.

Rolul dublu al membranelor cu enzime imobilizate, de separare si de biocatalizator, le fac din ce in ce mai atractive pentru procesele in care se utilizeaza enzime solubile. Membranele in functie de natura polimerului din care se obtin si de structura lor imobilizeaza enzimele in stare insolubila prin legare directa sau in stare solubila la suprafata de separare.

Obiectivul principal al acestei lucrari a fost obtinerea de membrane cu enzime imobilizate. In acest scop au fost obtinute doua tipuri de membrane din polimeri functionalizati, destinate imobilizarii enzimelor prin legare si respectiv din polimeri nemodificati, utilizate la imobilizarea enzimelor in stare solubila. Pe membranele obtinute au fost imobilizate, prin diverse tehnici, enzime de interes practic.

Un alt obiectiv important al lucrarii l-a constituit utilizarea membranelor cu enzime imobilizate in procese biocatalitice.

Lucrarea este structurata in doua parti cuprinzand un referat de literatura si respectiv o parte experimentală in care sunt prezentate contributiile originale in domeniul studiat.

In cadrul **primului capitol** au fost prezentate metodele generale de imobilizare a enzimelor. In corelatie cu acesta, in cel de-**al doilea capitol** sunt descrise tehnicile de obtinere a membranelor cu enzime imobilizate, iar in **al treilea capitol** au fost abordate aspecte privind aplicatiile acestora.

Partea experimentală incepe cu cel de-**al patrulea capitol** si cuprinde rezultate privind selectarea polimerilor destinati prepararii membranelor cu enzime imobilizate.

Datele experimentale obtinute la imobilizarea enzimelor pe membrane si caracterizarea fizico-chimica a complexului membrana-enzima sunt prezentate in **capitolul cinci**.

In **ultimul capitol** au fost studiate doua procese biocatalitice cu ajutorul enzimelor imobilizate pe membrane obtinute in fazele anterioare.

Lucrarea contine 216 pagini, 99 figuri, 63 tabele, dintre care 75 figuri si 49 tabele in partea experimentală si 315 referinte bibliografice.

Teza de doctorat este structurata dupa cum urmeaza.

## CUPRINS

	pag.
<b>INTRODUCERE</b>	<b>4</b>
<b>CAP. 1 METODE GENERALE DE IMOBILIZARE A ENZIMELOR</b>	<b>6</b>
1.1. Scurt istoric	6
1.2. Obținerea, separarea și purificarea enzimelor utilizate în procesul de imobilizare	9
1.3. Metode de imobilizare a enzimelor și a celulelor microbiene	13
1.3.1. Metode de imobilizare prin insolubilizarea enzimei	15
1.3.1.1. Includerea enzimelor în suportul de imobilizare	15
1.3.1.1.1. Includerea în gelul unui polimer reticulat	15
1.3.1.1.2. Includerea în fibre	17
1.3.1.1.3. Microincapsularea	18
1.3.1.2. Imobilizarea enzimelor prin legare	20
1.3.1.2.1. Legarea prin reticulare	22
1.3.1.2.2. Imobilizarea enzimelor cu formare de legături suport-enzima	27
1.3.2. Metode de imobilizare prin menținerea enzimei în stare solubilă	46
1.4. Analiza critică a metodelor de imobilizare a enzimelor. Concluzii	47
<b>CAP. 2 OBȚINEREA MEMBRANELOR CU ENZIME IMOBILIZATE</b>	<b>50</b>
2.1. Membrane și procese de membrană	50
2.1.1. Clasificarea, metodele de obținere și caracterizarea membranelor	50
2.1.1.1. Clasificarea membranelor	50
2.1.1.2. Metode de obținere a membranelor	53
2.1.1.3. Caracterizarea membranelor	58
2.1.2. Procese de membrană și module membranare	64
2.1.2.1. Procese de membrană	64
2.1.2.2. Module membranare	66
2.2. Imobilizarea enzimelor pe membrane	72
2.2.1. Metode de obținere a membranelor cu enzime imobilizate prin insolubilizarea enzimei	73
2.2.1.1. Membrane cu enzime imobilizate prin includere	73
2.2.1.2. Membrane cu enzime imobilizate prin legare	75
2.2.1.2.1. Membrane cu enzime imobilizate prin adsorbție fizică	75
2.2.1.2.2. Membrane cu enzime imobilizate prin legături ionice	78
2.2.1.2.3. Membrane cu enzime imobilizate prin legături covalente	79
2.2.2. Metode de obținere a enzimelor imobilizate pe membrane cu menținerea enzimei în stare solubilă	84
2.2.2.1. Imobilizarea enzimelor în celule de ultrafiltrare fără modificarea structurii enzimelor	85
2.2.2.2. Imobilizarea enzimelor în celule de ultrafiltrare cu modificarea structurii	86
<b>Cap. 3 APLICAȚIILE MEMBRANELOR CU ENZIME IMOBILIZATE</b>	<b>88</b>
3.1. Utilizarea membranelor cu enzime imobilizate în construcția și funcționarea bioreactoarelor	89
3.1.1. Generalități	89
3.1.2. Clasificarea bioreactoarelor membranare enzimatică (BME)	92
3.1.2.1. Bioreactoare membranare cu biocatalizator suspendat	93
3.1.2.2. Bioreactoare membranare cu biocatalizator imobilizat	95
3.2. Aplicații ale bioreactoarelor membranare enzimatică	97
3.2.1. Aplicațiile bioreactoarelor membranare enzimatică în industria alimentară	97
3.2.2. Aplicațiile bioreactoarelor membranare enzimatică în industria farmaceutică, medicina și biochimie	98
3.2.3. Alte aplicații ale bioreactoarelor enzimatică	99
<b>PARTE EXPERIMENTALA</b>	<b>100</b>
Considerații generale	100
<b>CAP.4 SELECTAREA POLIMERILOR PENTRU OBȚINEREA MEMBRANELOR CU ENZIME IMOBILIZATE</b>	<b>101</b>
4.1. Activarea polimerilor pentru obținerea membranelor destinate imobilizării enzimelor prin legare	101
4.1.1. Activarea polisulfonei prin reacții de acilare Friedel-Crafts	102
4.1.2. Activarea polifenilenoxidului prin bromurare radicalică	113
4.2. Selectarea polimerilor pentru realizarea membranelor de ultrafiltrare destinate imobilizării enzimelor în stare solubilă	130
4.2.1. Obținerea de membrane de ultrafiltrare cu și fără suport	130
4.2.2. Reologia soluțiilor polimerice utilizate la prepararea membranelor	144
<b>CAP.5 IMOBILIZAREA ENZIMELOR PE SUPTURI POLIMERICE ȘI CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICA A MEMBRANELOR CU ENZIME IMOBILIZATE</b>	<b>164</b>
5.1. Imobilizarea enzimelor prin legare covalentă pe membrane activate	171
5.2. Imobilizarea enzimelor pe polimeri activați și formarea ulterioară a membranelor	176
5.3. Imobilizarea enzimelor în stare solubilă prin ultrafiltrare	178
5.4. Imobilizarea enzimelor prin adsorbție-reticulare	181
<b>CAP. 6 STUDIUL PROCESELOR ÎN CARE INTERVIN MEMBRANE CU ENZIME IMOBILIZATE</b>	<b>183</b>
6.1. Hidroliza enzimatică a amidonului cu sistemul $\alpha$ -amilaza-amiloglucozidaza imobilizate pe membrane	183
6.2. Studiul cinetic al procesului de zaharificare a maltodextrinei utilizând amiloglucozidaza imobilizată pe membrane prin legare covalentă	190
6.3. Hidroliza enzimatică a zaharozei cu invertaza imobilizată în stare solubilă în celula de ultrafiltrare	198
<b>CONCLUZII</b>	<b>202</b>
<b>BIBLIOGRAFIE</b>	<b>205</b>

**În cele ce urmează este prezentat un rezumat al principalelor date originale conținute în lucrare. Numerotarea figurilor și a tabelelor corespunde cu cea din teza.**

## PARTE EXPERIMENTALA

### Consideratii generale

Scopul lucrării este obtinerea de membrane cu enzime imobilizate. Datele prezentate in literatura de specialitate, referitoare la acest domeniu, au pus in evidenta diverse modalitati de imobilizare a enzimelor pe membrane. Dintre acestea am abordat doua directii principale de lucru, si anume:

- imobilizarea enzimelor pe membrane realizate din polimeri activati, prin legare;
- imobilizarea enzimelor in stare solubila pe membrane de ultrafiltrare realizate din polimeri nemodificati.

In acest scop in prima etapa au fost activati doi polimeri, prin diverse metode, din cadrul carora au fost ulterior selectati polimerii adecvati imobilizarii enzimelor prin legare. Totodata, au fost obtinute membrane de ultrafiltrare din mai multi polimeri, dintre care, in functie de caracteristicile structurale si de curgere au fost retinute cele cu capacitatea cea mai buna de imobilizare in stare solubila a enzimelor.

In a doua etapa pe suporturile selectionate au fost imobilizate enzimele  $\alpha$ -amilaza, amiloglucozidaza, ureaza si invertaza atat in stare legata cat si in stare solubila.

Membranele cu enzime imobilizate au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic intr-o a treia etapa.

In pasul urmator unele dintre enzimele imobilizate pe membrane, in stare legata sau solubila, au fost studiate in procese de hidroliza enzimatica urmarindu-se capacitatea catalitica a acestora.

In final, a fost realizat un bioreactor cu functionare in regim continuu, pentru hidroliza enzimatica a solutiilor de zaharoza, utilizand invertaza imobilizata intr-o celula de ultrafiltrare.

## CAP. 4. SELECTAREA POLIMERILOR PENTRU OBTINEREA MEMBRANELOR CU ENZIME IMOBILIZATE

Pentru selectarea polimerilor destinati obtinerii membranelor pe care se pot imobiliza enzime s-au avut in vedere mai multi factori, printre care: natura polimerului, capacitatea de prelucrare sub forma de membrane, rezistenta la o gama cat mai larga de compusi (solventi, acizi si baze), reactivitatea in procese de grefare a unor grupari active capabile sa lege enzimele si accesibilitatea.

Pornind de la frecventa cu care sunt citati in literatura de specialitate au fost luati in studiu, pentru activare, polisulfona si polifenilenoxidul.

Pentru realizarea de membrane de ultrafiltrare destinate retinerii la suprafata a enzimelor in stare solubila au fost studiatii urmatorii polimeri: polisulfona (indigena, de tip UDEL si de tip ULTRASON) si acetatii de celuloza.

### 4.1. Activarea polimerilor pentru obtinerea membranelor destinate imobilizarii enzimelor prin legare

Una din metodele de imobilizare se bazeaza pe formarea unor legaturi chimice covalente intre suportul polimeric si enzima, prin intermediul unor grupari active existente pe membrana:  $-R-COOH$ ,  $-Ar-COOH$ ,  $-COOR$ ,  $-CH_2Br$ .

In utilizarea polimerilor ca materiale membranare corelarea structura / proprietati (permeabilitate, afinitate chimica specifica, porozitate) reprezinta un aspect important.

Polisulfona a fost modificata chimic prin introducerea de grupari alchil-carboxil, aril-carboxil si grupari esterice prin reactii de acilare Friedel-Crafts, iar polifenilenoxidul prin bromurare radicalica in catena laterala

#### 4.1.1. Activarea polisulfonei prin reactii de acilare Friedel-Crafts

Reactiile chimice de obtinere a polisulfonei cu grupari alchil-carboxil, aril-carboxil si cu grupari esterice sunt prezentate in figurile nr.25, 26 si 27.

Pentru fiecare din cele trei sinteze de polisulfona modificata au fost efectuate cate cinci experimente in care s-au mentinut constante conditiile de lucru, singurul parametru variabil fiind raportul molar polisulfona (PSF) / agent de acilare /  $AlCl_3$ .

Aspectele cele mai importante care s-au urmarit in aceste sinteze au fost:

- dilutia si omogenitatea amestecului de reactie;
- adaugarea solutiei polimerice cu debit constant, sub agitare continua;
- termostatarea vasului de reactie pentru a evita aparitia supraincalzirilor locale;
- prelucrarea adecvata a amestecului de reactie in scopul diminuarii pierderilor pe parcursul etapelor si al obtinerii unui randament cat mai bun in substanta pura.

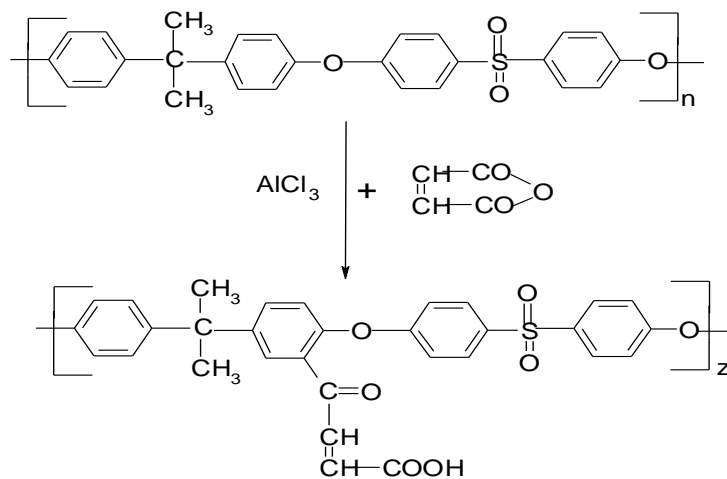


Fig. nr. 25 Activarea polisulfonei prin acilare cu anhidrida maleica

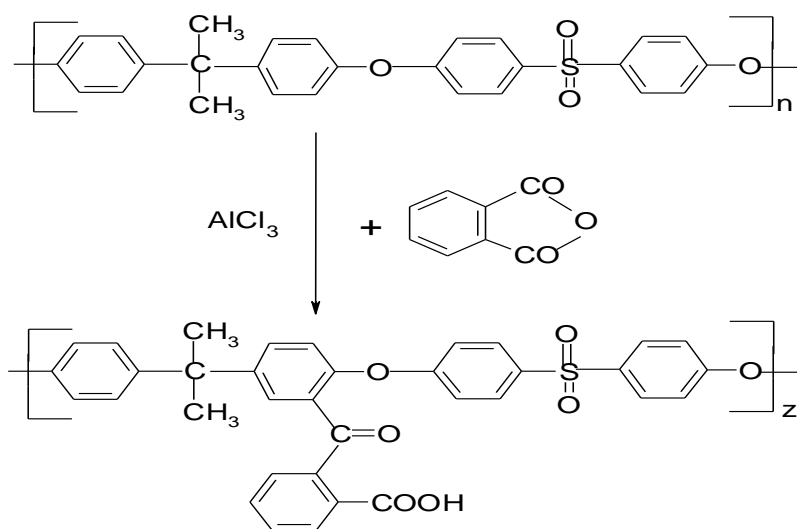


Fig. nr. 26 Activarea polisulfonei prin acilare cu anhidrida ftalica

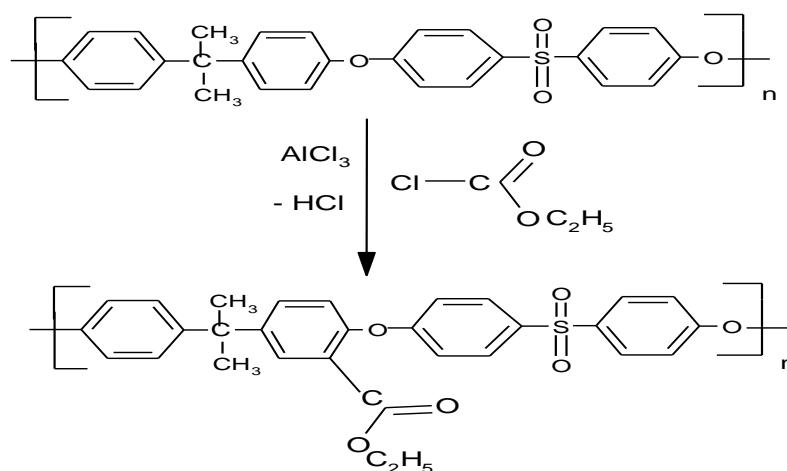


Fig.nr. 27 Activarea polisulfonei prin acilare cu cloroformiat de etil

### Rezultate obtinute si comentarii

Procesele au fost urmarite prin determinarea randamentului in produsul de acilare. Rezultatele obtinute la activarea polisulfonei prin acilare cu cei trei reactivi sunt prezentate in tabelele nr. 15 - 17.

Tabel. nr.15. **Rezultate experimentale la acilarea polisulfonei cu anhidrida maleica**

Nr.experiment	Raport molar PSF / anhidrida maleica / $AlCl_3$	Randament, %
1	1 / 2 / 2,4	32,6
2	1 / 2,25 / 2,7	49,4
3	1 / 2,5 / 3	58,2
4	1 / 2,75 / 3,3	59,6
5	1 / 3 / 3,6	59,9

Tabel nr.16. **Rezultate experimentale la acilarea polisulfonei cu anhidrida ftalica**

Nr. experiment	Raport molar PSF / anhidrida ftalica / $AlCl_3$	Randament, %
1	1 / 2 / 2,4	58,5
2	1 / 2,25 / 2,7	63,4
3	1 / 2,5 / 3	71,6
4	1 / 2,75 / 3,3	89,7
5	1 / 3 / 3,6	90,1

Tabel nr.17. **Rezultate experimentale la acilarea polisulfonei cu cloroformiat de etil**

Nr. experiment	Raport molar PSF / cloroformiat de etil / $AlCl_3$	Randament, %
1	1 / 2 / 2,4	27,4
2	1 / 2,25 / 2,7	38,5
3	1 / 2,5 / 3	38,7
4	1 / 2,75 / 3,3	39,1
5	1 / 3 / 3,6	39,0

Asa cum reiese din datele prezentate in tabelele nr. 15 – 17 cresterea raportului molar polisulfona / agent de acilare / clorura de aluminiu (intre ultimii doi compusi mentinandu-se un raport constant de 1 / 1,2) duce la o marire corespunzatoare a randamentului pana la o anumita valoare, dupa care variatia acestuia devine nesemnificativa. Explicatia consta in faptul ca pe masura ce creste cantitatea de reactanti si catalizator are loc si marirea viscozitatii masei de reactie. Din acest motiv procesul devine neuniform la valori prea mari corespunzatoare reactantilor si catalizatorului. In plus, creste riscul de scapare de sub control a reactiei ca urmare a accelerarii acesteia. Astfel ca rapoartele optime pentru activarea polisulfonei prin reactii de acilare sunt:

acilare cu anhidrida maleica: 1 / 2,5 / 3  $\Rightarrow \eta_{\text{optim}} = 58,2 \%$

acilare cu anhidrida ftalica: 1 / 2,75 / 3,3  $\Rightarrow \eta_{\text{optim}} = 89,7 \%$

acilare cu cloroformiat de etil: 1 / 2,25 / 2,7  $\Rightarrow \eta_{\text{optim}} = 38,5 \%$

Compusii corespunzatori variantelor optime au fost caracterizati structural in vederea punerii in evidenta a grupurilor functionale prin spectroscopie in IR si RMN.

Modificarile introduse de grupele acil in polimerii PSF-AM, PSF-AF si PSF-FE se manifesta si asupra valorilor de temperatura la care apare tranzitia vitroasa ( $T_G$ ).

Determinarea tranzitiei vitroase ( $T_G$ ) pentru cele patru probe de polimer (polimeri modificati si polimer etalon) a fost realizata cu ajutorul unui aparat DSC Du Pont 990. Masuratorile s-au facut in atmosfera (aer), la un gradient de temperatura de 20°C/min.

S-au obtinut urmatoarele rezultate (tabel nr. 19):

Tabel nr. 19  $T_G$  pentru polimeri modificati si polimerul etalon

Nr. crt.	Polimer	$T_G$ , °C
1	PSF nemodificata	192
2	PSF-AM	170
3	PSF-AF	147
4	PSF-FE	114

Se constata ca in urma grefarii grupelor functionale de tip acil pe polisulfona apare o scadere a temperaturii de tranzitie vitroasa a polimerilor modificati obtinuti.

#### 4.1.2. Activarea polifenilenoxidului prin bromurare radicalica

Polifenilenoxidul (PPO) este un polimer care, datorita caracteristicilor sale, se utilizeaza rar la prepararea de membrane de micro- si ultrafiltrare. Structura sa chimica prezentata in figura nr. 37 poate fi modificata atat prin reactii heterolitice la nucleul aromatic, cat si prin reactii homolitice la gruparile metil.

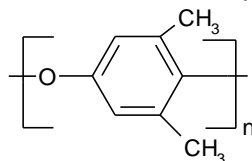


Fig. nr. 37 Structura chimica a polifenilenoxidului

Dintre cele doua variante de modificare prezinta un interes deosebit pentru obtinerea unui polimer activat introducerea atomilor de halogen (Cl sau Br) la gruparile metil, deoarece pe aceasta cale se obtin resturi benzilice cu reactivitate marita. Gruparile legate de nucleul benzenic prin reactii heterolitice nu sunt accesibile gruparilor reactive din lantul proteic al enzimelor, fie datorita fenomenului de impiedicare sterica, fie datorita reactivitatilor reduse.

Dintre caile de bromurare ale acestui polimeri a fost selectata varianta bromurarii radicalice cu bromsuccinimida in prezenta unui initiator radicalic, procesul fiind mult mai usor de controlat.

Scopul urmarit este de a obtine un polimer modificat in care atomul de brom se leaga la o singura grupare metil, acesta avand structura optima imobilizarii enzimelor. Legarea atomilor de brom la ambele grupari metil din secventa PPO sau a mai multor atomi de brom (2 sau 3) de aceeasi grupare metil ii reduce capacitatea acestuia de a imobiliza enzime datorita fenomenelor de impiedicare sterica.

Dintre diferitele sorturi de polifenilenoxid utilizate, provenite de la firme ca Aldrich, General Electric, BASF, Centrul de Cercetari Materiale Plastice-ICECHIM, cele mai bune rezultate le-a dat polifenilenoxidul produs de catre CCMP-ICECHIM care contine oligomeri intr-o proportie nedecelabila.

In **concluzie** varianta optima de bromurare a polifenilenoxidului este cea in care se utilizeaza polifenilenoxidul de productie indigena, bromsuccinimida ca reactant, azo-izo-butironitrilul ca initiator si tetracolorura de carbon ca solvent.

Schema reactiei de bromurare este prezentata in figura nr. 38.

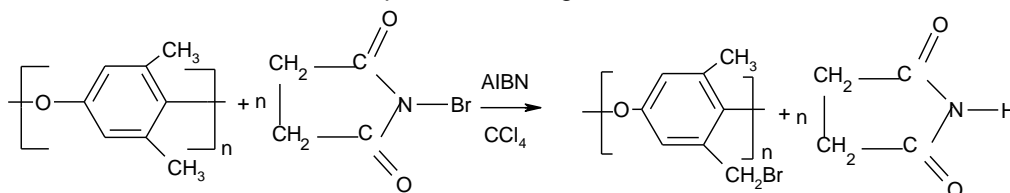


Fig. nr. 38 Reactia de bromurare radicalica a polifenilenoxidului

Pe parcursul experimentelor s-a urmarit obtinerea unui produs bromurat cu preponderenta la o singura grupare metil, prin schimbarea raportului molar polimer : N-bromsuccinimida.

Produsul final a fost caracterizat prin spectroscopie RMN, care ofera date referitoare la gradul de bromurare si pozitia bromului fixat, precum si prin determinarea timpului de gelifiere, care pune in evidenta reactivitatea radicalilor  $-CH_2Br$  din lantul polimeric.

#### Rezultate obsinute ii comentarii

Au fost efectuate patru seturi de experimente in cadrul carora s-a studiat influenta raportului molar dintre polimer si reactanti, precum si modalitatea de adaugare a reactantilor in masa de reactie, asupra gradului si modului de bromurare a polifenilenoxidului.

In primul set de experimente studiul a fost efectuat pentru 4 rapoarte molare diferite, reactantii fiind adaugati intr-o singura portie, dupa dizolvarea polimerului. Cele patru rapoarte molare au fost stabilite in jurul raportului teoretic (stoechiometric) de 1/1 intre PPO si bromsuccinimida, valoare corespunzatoare bromurarii unei singure grupari metil din catena laterala.

In experimentele efectuate in primul set reactia a decurs violent si a fost greu de controlat, ducand la formarea unor proportii mari de grupari metil dibromurate.

Rezultatele obtinute pun in evidenta faptul ca odata cu cresterea continutului de PPO in masa de reactie are loc si o crestere corespunzatoare a gradului de bromurare prin introducerea unui singur atom de brom la gruparile metil si scade procentul de grupari metil dibromurate.

Plecand de la aceste constatari s-a urmarit in urmatoarele trei seturi de experimente diminuarea numarului de radicali liberi existenti la un moment dat in masa de reactie prin adaugarea reactantilor (NBS + AIBN) in doua, trei si respectiv patru portii egale.

Rezultatele inregistrate demonstreaza valabilitatea constatarii ca marirea cantitatii de PPO in masa de reactie simultan cu divizarea cantitatii de reactanti in mai multe portiuni duce la disparitia compusilor dibromurati si la cresterea gradului de bromurare la gruparile  $-\text{CH}_2\text{Br}$ .

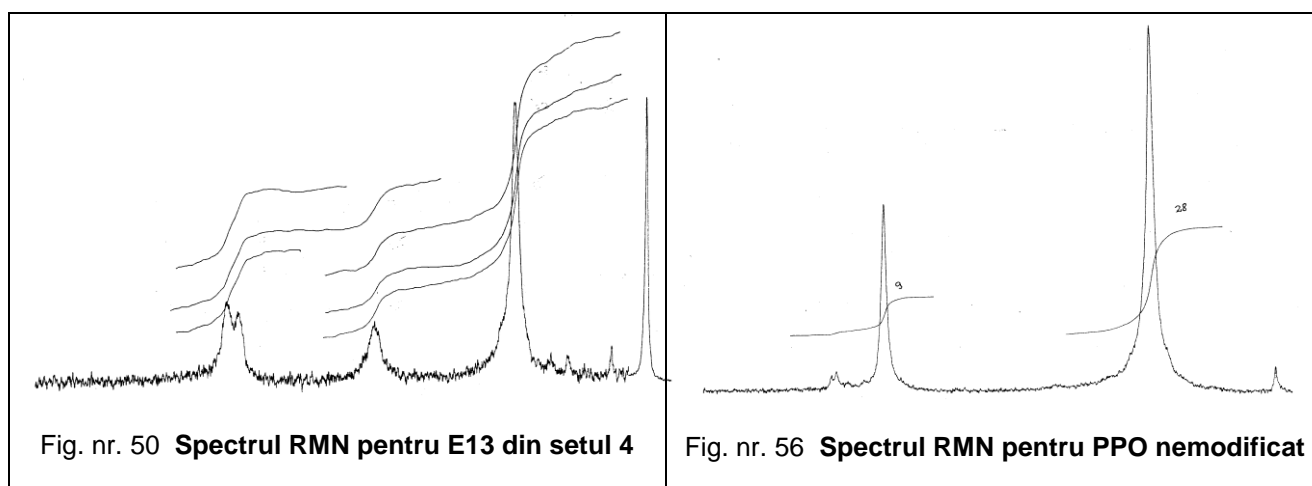
Din experimente a rezultat ca raportul maxim in care se poate introduce polimerul fata de NBS este de 1,2 / 1. De aceea intr-un ultim set de experimente s-a pastrat constant acest raport, iar in scopul obtinerii unui grad mai mare de bromurare, cantitatea de reactanti a fost introdusa in 4 portiuni egale la intervale egale de timp. Au fost efectuate 6 experimente in aceleasi conditii pentru a verifica reproductibilitatea metodei.

Rezultatele corespunzatoare celor sase experimente sunt redate in tabelul nr. 23, iar spectrul RMN aferent experimentului E13 in figura nr. 50. Pentru comparatie cu spectrul prezentat, in figura nr. 56 este redat spectrul RMN al polifenilenoxidului nemodificat, utilizat in experimente.

Tabel nr. 23 **Rezultate obtinute in setul nr. 4 de experimente de bromurare a PPO**

Nr. exp.	Raport molar PPO / NBS / AIBN	$-\text{CH}_2\text{Br}$ (%)	$-\text{CHBr}_2$ (%)	Timp gelifiere (s)
E13	1,2 / 1 / 0,05	28	0	50
E14	1,2 / 1 / 0,05	27,5	0	65
E15	1,2 / 1 / 0,05	27,5	0	60
E16	1,2 / 1 / 0,05	28,8	0	45
E17	1,2 / 1 / 0,05	29	0	40
E18	1,2 / 1 / 0,05	28,7	0	40

NBS - N-bromsuccinimida; PPO - polifenilenoxid; AIBN - azo-bis-izobutironitril



Ca urmare a rezultatelor obtinute se considera **optima** varianta in care raportul molar intre componentii PPO / NBS / AIBN este de **1,2 / 1 / 0,05**, iar reactantii se adauga in patru portiuni egale.

#### Concluzii la cap. 4.1.

Dintre polimerii activati prin acilarea polisulfonei au fost selectati pentru realizarea de membrane cu enzime immobilizate urmatoarii:

- polisulfona acilata cu anhidrida maleica (**PSF-AM**);
- polisulfona acilata cu anhidrida ftalica (**PSF-AF**);
- polisulfona acilata cu resturi esterice (**PSF-FE**).

Din cele 3 clase se utilizeaza acei polimeri obtinuti dupa reteta care asigura randamentul maxim de grefare a gruparilor reactive.

Din gama polimerilor de tipul polifenilenoxid bromurat au fost retinuti pentru experimente de immobilizare cei care contin doar grupari metil monobromurate si al caror grad de bromurare depaseste 25%.

#### 4.2. Selectarea polimerilor pentru realizarea membranelor de ultrafiltrare destinate imobilizării enzimelor în stare solubilă

Pentru imobilizarea enzimelor pe membrane de ultrafiltrare condiția obligatorie este ca acestea să aibă dimensiuni ale porilor mai mici decât diametrul macromoleculii proteice.

În general sunt utilizate membrane de ultrafiltrare cu structura asimetrică obținute prin procesul inversiei de fază, dintr-o gamă largă de polimeri.

Datorită accesibilității, pretului de cost scăzut, prelucrării ușoare și rezistenței într-o gamă largă de pH, cei mai utilizați polimeri pentru prepararea membranelor de ultrafiltrare sunt citați în literatura de specialitate **polisulfona** și **derivatii de celuloză**. Ca urmare au fost luate în studiu, la nivel de laborator, trei sortimente de polisulfona (polisulfona de tip **UDEL**, **ULTRASON** și de **producție indigenă**) și două tipuri de acetati de celuloză (**monoacetat** și **diacetat**).

Din polimerii luați în lucru au fost realizate membrane de ultrafiltrare cu și fără suport. Datele acumulate la nivel de laborator au fost utilizate la realizarea unei instalații cu funcționare continuă pentru obținerea de membrane de ultrafiltrare cu proprietăți structurale și hidrodinamice reproductibile.

##### 4.2.1. Obținerea de membrane de ultrafiltrare cu și fără suport

Tehnica de lucru utilizată pentru obținerea membranelor de UF este inversia de fază. Prepararea membranelor prin această metodă utilizând tehnica imersie-precipitare, a constat în obținerea unor soluții din polimerii menționați, în dimetilformamidă și în N-metil piperidină, cu diverse concentrații, urmată de filtrarea soluțiilor polimerice pentru îndepărtarea impurităților mecanice. Cei doi solvenți au fost selectați datorită solubilizării polimerilor la temperatura camerei până la concentrații corespunzătoare obținerii membranelor de ultrafiltrare.

Pentru obținerea membranelor fără suport, soluțiile au fost aplicate sub formă unei pelicule direct pe o suprafață netedă (sticlă), cu ajutorul unui tragător denumit generic "doctor blade", apoi s-a realizat precipitarea polimerului în baie de coagulare.

Membranele cu suport au fost realizate prin peliculizarea soluției polimerice pe un suport montat pe suprafața netedă de sticlă, cu același tragător.

Fazele procesului prin care au fost obținute membranele de ultrafiltrare, cu sau fără suport, la nivel de laborator, sunt prezentate schematic în figura nr. 57.

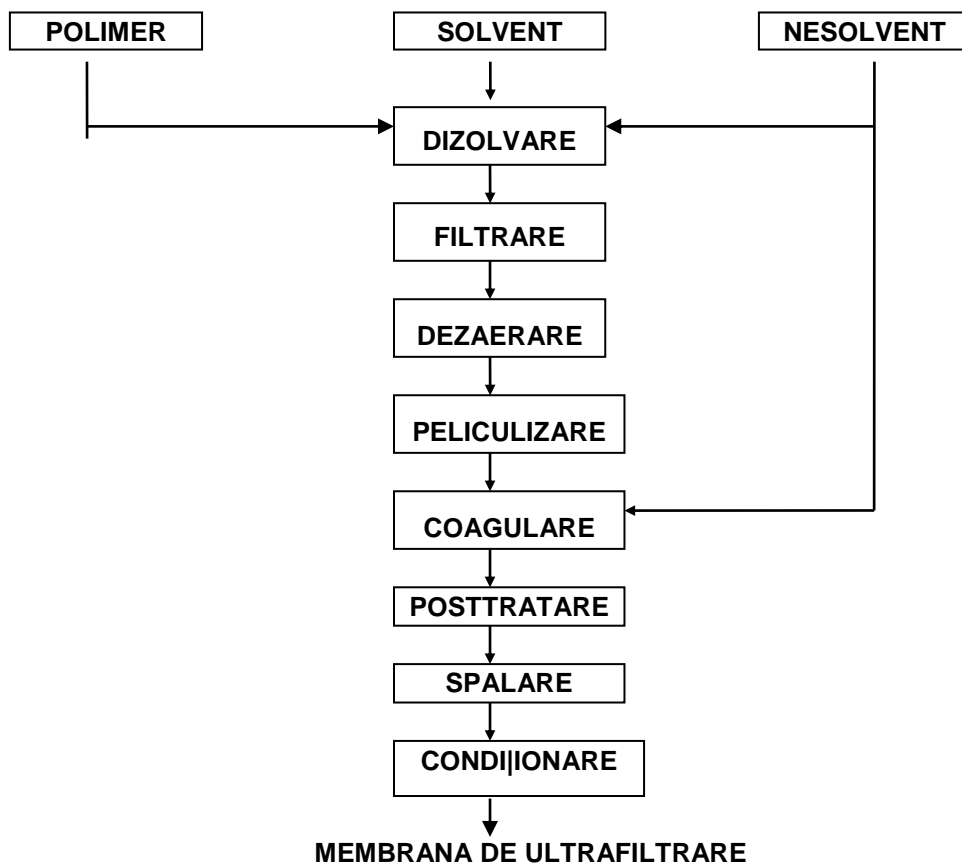


Fig.nr. 57 Schema fluxului de preparare a membranelor de ultrafiltrare

### Caracterizarea membranelor polimerice

Membranele polimerice cu structura asimetrica obtinute din polimerii studiatii au fost caracterizate prin determinarea marimii, distributiei porilor si a caracteristicilor de curgere.

Pentru caracterizarea membranelor polimerice din punct de vedere structural s-a utilizat aparatul COULTER POROMETER, care este dotat cu un sistem de analiza, sistem de calcul, sistem de vizualizare si sistem de transcriere a informatiilor referitoare la diametrul minim, maxim si mediu al porilor situati peste valoarea de 0,05  $\mu\text{m}$ , precum si a numarului total de pori /  $\text{cm}^2$ .

Pentru pori cu dimensiuni mai mici de 0,05  $\mu\text{m}$  (sub limita de detectie a porometrului) caracterizarea membranelor s-a realizat prin determinarea valorii de "cut-off". Metoda de caracterizare consta practic in parcurgerea urmatoarelor etape: trecerea prin membrana studiata de solutii de proteine globulare de mase moleculare cunoscute, stabilirea gradului de retentie pentru acestea, reprezentarea grafica a retentiei functie de masa moleculara a proteinelor si interpolarea pentru o retentie de 90%.

În scopul obtinerii prin spectroscopie UV-VIS a curbelor de etalonare (absorbție în functie de concentratia solutiilor proteice) s-a studiat un set de cinci proteine si anume: **Citocrom C**, **Lysosyme**,  **$\alpha$ -Chimotripsina**,  **$\beta$ -Lactoglobulina** si  **$\gamma$ -Globulina**.

Utilizand datele obtinute pentru proteinele etalon, s-au determinat masele moleculare de excludere ("cut-off") pentru membranele ale caror caracteristici structurale obtinute prin porometrie au evidentiat dimensiuni de pori sub 0,05 $\mu\text{m}$ .

Determinarea masei moleculare de siguranta este destul de laborioasa, intrucat se realizeaza printr-o serie de experimente de ultrafiltrare, pentru fiecare experiment de ultrafiltrare utilizandu-se o singura solutie care contine un singur component proteic.

Se înregistreaza spectrul UV-VIS al solutiei initiale de proteina înainte de a fi supusa ultrafiltrarii, iar dupa ultrafiltrare se inregistreaza spectrele UV-VIS ale concentratului si permeatului. Pe baza curbelor de etalonare obtinute se determina concentratiile proteice din permeat si concentrat.

Retentia fiecarei proteine pe membrana de ultrafiltrare se calculeaza din relatia:

$$R = \left( 1 - \frac{c_{\text{permeat}}}{c_{\text{concentrat}}} \right) \times 100$$

Pentru evaluarea unei retentii reale, trebuie luata în considerare si variatia în timp a concentratiilor din cele doua compartimente. Valorile astfel calculate vor tinde asimptotic catre o valoare a retentiei R de 100%, care exprima gradul de retinere a unui anumit solvit în conditii experimentale.

Limita de excludere nu este neta ci variaza în anumite limite, ceea ce conduce la concluzia ca retentia experimentală nu atinge valoarea maxima de 100%. Se defineste din acest motiv valoarea maxima a masei moleculare de siguranta (M), ca valoare numerica a lui M corespunzatoare punctului de intersectie dintre tangenta la curba si palierul R = 100%.

Caracteristicile hidrodinamice sunt date de fluxul normalizat de apa distilata definit ca flux de permeat determinat la presiunea standard de 1 bar. Acestea sunt determinate cu ajutorul modulului tip CELFA MEMBRANE SYSTEME.

### Rezultate obtinute si comentarii

Pentru realizarea membranelor de ultrafiltrare cu si fara suport in prima etapa au fost preparate solutii de concentratii cuprinse între 10 si 20% din toti polimerii mentionati, utilizand ca solvent dimetilformamida. Scopul propus a fost studierea influentei concentratiei asupra caracteristicilor structurale si hidrodinamice. Solutiile au fost peliculizate pe un suport de sticla cu ajutorul unui tragator cu fanta de 0,3 mm, iar coagularea s-a realizat in apa demineralizata.

Rezultatele obtinute sunt prezentate in tabelele nr. 30 – 38 din teza. Pentru exemplificare in acest rezumat sunt redate rezultatele corespunzatoare membranelor obtinute din polisulfona de tip ULTRASON si din monoacetat de celuloza, iar comentariile se refera la toate tipurile de polimeri utilizati.

Tabel nr.36 **Influenta concentratiei asupra structurii membranelor obtinute din PSF ULTRASON**

Nr. crt.	Conc. polimer, %	$d_{\text{min}}$ $\mu\text{m}$	$d_{\text{max}}$ $\mu\text{m}$	$d_{\text{mediu}}$ $\mu\text{m}$	cut-off, Da	Flux AD l/m <sup>2</sup> h
1	10	0,214	0,321	0,275	-	1958
2	12	0,107	0,218	0,145	-	1614
3	14	0,05	0,091	0,075	-	961
4	16	-	-	-	18.000	689
5	18	-	-	-	12.000	525
6	20	-	-	-	8.000	312

Tabel nr.38 **Influenta concentratiei asupra structurii membranelor obtinute din monocetat de celuloza**

Nr.crt.	Conc. polimer, %	$d_{min}, \mu m$	$d_{max}, \mu m$	$d_{mediu}, \mu m$	cut-off, Da	Flux AD, l/m <sup>2</sup> h
1	10	0,282	0,395	0,312	-	1849
2	12	0,193	0,316	0,204	-	1468
3	14	< 0,05	0,146	0,095		836
4	16	-	-	-	21.000	564
5	18	-	-	-	17.000	389
6	20	-	-	-	12.000	267

Rezultatele obtinute pun in evidenta faptul ca odata cu cresterea concentratiei solutiilor polimerice se obtin membrane din ce in ce mai dense, diametrul porilor (minim, maxim si mediu) fiind in descrestere continua. In corelatie cu acestia are loc si scaderea fluxului normalizat de apa. Variatiile difera de la un polimer la altul constatandu-se ca polimerii cu mase moleculare mari duc la formarea de membrane mai poroase.

Polisulfonele din import de tip UDEL si ULTRASON, care au o distributie uniforma si restransa in jurul valorii masei moleculare, duc la obtinerea de membrane cu structura asimetrica adecvata: diferenta dintre diametrul maxim si minim al porilor este mica, porii fiind distribuiti dupa o curba Gaussiana. Totusi, dintre cele doua tipuri de polisulfona de import a fost selectata, pentru realizarea de membrane de ultrafiltrare, cea de tip ULTRASON deoarece la aceiasi valoare a concentratiei solutiei polimerice se obtine un cut-off mai mic. In acest fel selectivitatea membranei in procesul de imobilizare a enzimelor in stare solubila este mai mare.

Membranele obtinute din polisulfonele indigene au structuri neuniforme datorita diferentelor foarte mari intre diametrul maxim si minim al porilor. De aceea, acesti polimeri nu sunt adecvati pentru obtinerea membranelor de ultrafiltrare destinate imobilizarii enzimelor in stare solubila, neuniformitatea structurii ducand la o selectivitate scazuta.

Caracteristicile membranelor obtinute din acetatii de celuloza sunt in concordanta cu structurile acestora, in sensul ca din diacetat de celuloza, care are o masa moleculara mare, se obtin membrane mai poroase. Polimerul diacetat de celuloza la concentratii mari, corespunzatoare obtinerii membranelor de ultrafiltrare, se dizolva foarte greu si in unele situatii solutiile nu sunt perfect omogene. De aceea nici acest polimer nu va fi utilizat la prepararea membranelor de ultrafiltrare pentru imobilizarea enzimelor in stare solubila.

Toate membranele fara suport obtinute au o rezistenta mecanica relativ scazuta, unele fiind friabile (membranele obtinute din polisulfona indigena). Chiar daca membranele obtinute din polisulfona ULTRASON si din monoacetat de celuloza sunt mai rezistente, la presiunile de lucru mari proprii procesului de ultrafiltrare, unele din ele sunt distruse.

Din acest motiv au fost obtinute membrane din polimerii selectati pe un suport textil netesut, din import, destinat acestui domeniu.

In conditii de laborator solutiile polimerice sunt peliculizate, asa cum s-a mai amintit, cu ajutorul unui tragator. Datorita neuniformitatii miscarii (vitezei de tragere), membranele obtinute nu au aceeasi distributie a porilor pe toata suprafata. Un alt factor care contribuie la neuniformitatea porilor este modul diferit de la o membrana la alta in care suportul de sticla cu filmul polimeric este imersat in baia de coagulare. De aceea, a fost realizata o instalatie cu functionare continua in care dezavantajele mentionate sunt eliminate. Pentru a obtine membrane ale caror caracteristici se reproduc de la un experiment la altul, precum si pe toata suprafata acestora, au fost studiatii toti parametrii care intervin in procesul inversiei de faza, tehnica imersie-precipitare. Informatii referitoare la comportarea solutiilor polimerice in procesul de formare a membranelor, atat din punct de vedere al concentratiilor acestora, precum si din punct de vedere al adjuvantilor introdusi in scopul uniformizarii structurii microporoase, au fost obtinute prin studii reologice utilizand polisulfona ULTRASON.

#### 4.2.2. Reologia solutiilor polimerice utilizate la prepararea membranelor

Studiul comportarii reologice a solutiilor de polimeri prezinta o importanta practica deosebita oferind informatii pretioase pentru domeniul lor de aplicare.

Pornind de la premiza ca la obtinerea membranelor se folosesc solutii concentrate de polimer, in continuare se prezinta cateva aspecte legate de viscozitatea acestor solutii.

Comportarea reologica a solutiilor de polimeri poate fi influentata de o serie de factori, ca:

- masa moleculara si poldispersitatea polimerului;
- concentratia solutiei de polimer;
- natura solventului;
- efectul de forfecare sau gradientul de viteza aplicat;
- temperatura.

### Rezultate experimentale privind reologia solutiilor polimerice

Determinarile experimentale au avut ca scop studiul comportarii reologice a solutiilor de polisulfona utilizate pentru fabricarea membranelor semipermeabile. Solutiile au fost obtinute pe baza a doi solventi: dimetil-formamida si N-metilpirolidona. Concentratiile solutiilor au variat intre 8% si 16% (procente masice). Comportarea reologica a fost studiata la temperaturi cuprinse intre 10°C si 20°C. Influenta agentului tensioactiv (clorura de benzil-dimetil-hexadecil-amoniu, Fluka AG, C<sub>25</sub>H<sub>46</sub>CINxH<sub>2</sub>O, M=414,12) a fost evidentiata in domeniul de concentratii 10<sup>-4</sup>mol/l si 10<sup>-2</sup> mol/l.

Pentru a stabili modul de comportare a solutiilor in timpul curgerii, au fost supuse unei solicitari de forfecare pura, intr-un viscozimetru cu cilindri concentrice "Rheotest 2". Vitezele de forfecare au variat intre 2,5 s<sup>-1</sup> si 437,2 s<sup>-1</sup>. La fiecare valoare fixata a vitezei de forfecare s-a masurat tensiunea tangentiala si ulterior s-a calculat viscozitatea aparenta.

Pe baza masuratorilor facute a fost posibil sa se deduca modelul reologic valabil in timpul curgerii solutiilor luate in studiu. S-au stabilit de asemenea ecuatiile care redau influenta concentratiei polimerilor si a temperaturii asupra viscozitatii solutiilor, separat pentru fiecare din cei doi solventi.

Solutiile de polisulfona in dimetil-formamida si N-metilpirolidona au fost preparate prin dizolvarea polimerului in solvent, in diferite concentratii: 8%, 10%, 12%, 14% si 16%. Fiecare solutie a fost supusa solicitarii de forfecare la temperaturile de 10°C, 15°C si 20°C.. Din valorile masurate ale tensiunii tangentiale au fost calculate valorile viscozitatii aparente la fiecare viteza de forfecare utilizata.

In toate reogramele inregistrate pentru solutiile de PSF in DMF, dependenta tensiune – viteza de forfecare este liniara, caracteristica lichidelor newtoniene. Aceasta constatare este confirmata de valorile viscozitatii, care pentru o temperatura si o concentratie fixata, raman constante pe un domeniu foarte larg de variatie a solicitarii. In domeniul solicitarilor mici, cu viteze de forfecare de pana la 50 s<sup>-1</sup>, viscozitatea prezinta valori mai ridicate, ceea ce indica existenta unui prag de curgere caracteristic corpurilor plastice. Ca urmare, solutiile de polisulfona in dimetil-formamida sunt lichide viscoplastice, caracterizate printr-un prag de tensiune cu valori foarte mici, de ordinul Pa si au o comportare de tip newtonian in timpul curgerii.

Rezultatele obtinute in cazul solventului N-metil pirolidona sunt similare cu cele prezentate pentru dimetil-formamida. Comportarea acestor solutii este caracteristica lichidelor viscoplastice, in curgere manifestandu-se ca lichide newtoniene. Viscozitatea lor nu este influentata de solicitare ci numai de temperatura si concentratie.

Viscozitatea solutiilor de polisulfona este cel mai mult influentata de concentratia polisulfonei. In figura nr. 80 este redata variatia viscozitatii in functie de concentratie pentru solventul dimetil-formamida, iar in figura nr. 81 pentru solventul N-metil-pirolidona. Fiecare curba a fost trasata pentru una din temperaturile la care au fost facute determinarile.

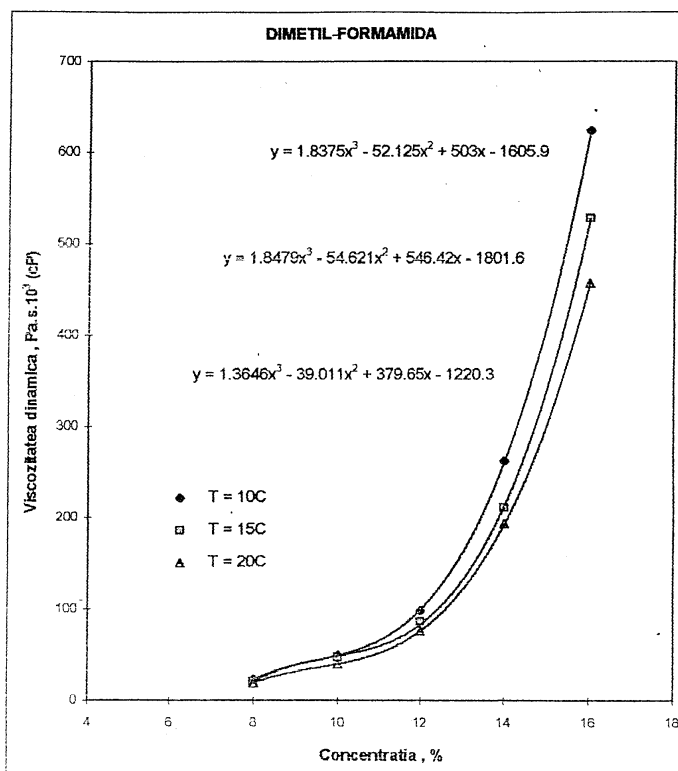


Fig.nr. 80 Variatia viscozitatii solutiilor de PSF in DMF in functie de concentratie

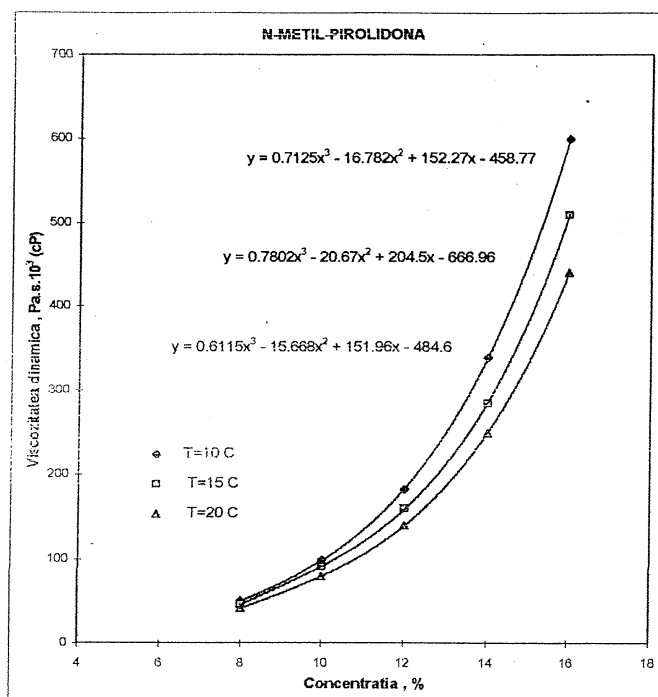


Fig.nr. 81 Variatia viscozitatii solutiilor de PSF in NMP in functie de concentratie

In reogramele din figurile nr. 80 si nr. 81 sunt redete si dependentele viscozitate – concentratie exprimate sub forma unor ecuatii matematice de tip polinom de gradul III, stabilite prin regresie polinomiala.

In aceste ecuatii concentratia este exprimata in procente masice iar viscozitatea in cP. Coeficientii de corelatie au avut in toate cazurile valoarea 1, ceea ce arata ca acest tip de ecuatie exprima cel mai exact variatia viscozitatii functie de concentratie.

Studiile reologice efectuate ofera informatii valoroase care, in corelatie cu cele obtinute din studiile referitoare la celelalte faze, duc la stabilirea parametrilor pentru obtinerea membranelor pe instalatia cu functionare continua.

Instalatia este constituita ca un sistem unitar format din patru subsisteme (module automatizate):

- MODUL I - sistem structura;
- MODUL II - sistem imersie;
- MODUL III - sistem rezervoare termostatate;
- MODUL IV - sistem de automatizare;

care permit stabilirea conditiilor optime de realizare a membranelor cu caracteristici reproductibile.

Instalatia modularizata prezinta urmatoarele avantaje:

- permite realizarea de membrane cu un strat sau cu mai multe straturi din solutii de polimeri cu timpi de coagulare diferiti, cu reproductibilitatea caracteristicilor membranei;
- asigura timpul optim de coagulare in timp real;
- permite obtinerea de membrane de ultrafiltrare destinate imobilizarii enzimelor cu caracteristici diferite in functie de natura biocatalizatorului, in cadrul aceluiasi ciclu de functionare;
- permite testarea diferitelor solutii polimerice intr-un timp relativ scurt, pentru realizarea de mostre de membrane destinate selectarii unei membrane cu anumite caracteristici structurale si hidrodinamice specifice unui anumit domeniu de aplicare.

Experimentele pe instalatia cu functionare continua au fost efectuate in urmatoarele conditii:

- ◇ polimerul utilizat: polisulfona (de tip ULTRASON-S3010-BASF, Germania)
- ◇ solventul folosit: DMF si NMP;
- ◇ concentratia solutiei polimerice: 9%, 10% si 11%, 14, 15%, 16% si 18%;
- ◇ temperatura barii de coagulare: 20 - 24°C;
- ◇ viteza de tragere: 6 m/min;
- ◇ fanta cutitului de tragere: 0,25 mm;
- ◇ sistem de imersie cu 14 role in configuratie spiralata.

Parametrii de mai sus au fost mentinuti la valori constante pentru toate tipurile de solutii polimerice urmarindu-se prin aceste experimente influenta naturii solventului asupra caracteristicilor structurale ale membranei.

Comparand caracteristicile membranelor obtinute prin dizolvarea polisulfonei in NMP, respectiv DMF se constata urmatoarele:

- solventul NMP asigura obtinerea unor membrane cu repartitie mai uniforma a diametrului porilor decat solventul DMF;

- odata cu cresterea concentratiei solutiei polimerice are loc micșorarea tuturor valorilor celor 3 diametre ale porilor (min., max. si mediu) asa cum s-a constatat si la obtinerea membranelor in proces discontinuu;

- pentru aceeasi concentratie de polimer utilizand cei doi solventi se observa ca fluxurile de apa prin membranele obtinute cu NMP sunt mai mari decat cele obtinute cu DMF chiar daca diametrele medii ale porilor sunt mai mari in cazul utilizarii DMF; explicatia este data de numarul total al porilor pe unitatea de suprafata mai mic in cazul utilizarii DMF.

Din aceste constatari s-a selectat ca solvent optim **N-metilpirolidona**, care a fost utilizata pentru dizolvarea polimerilor in experimentele ulterioare.

Rezultatele obtinute la caracterizarile membranelor de ultrafiltrare atat din polisulfona cat si din acetat, utilizand NMP ca solvent, sunt prezentate in tabelul nr. 41.

Tabel nr.41 **Caracteristicile structurale si hidrodinamice ale membranelor de ultrafiltrare**

Nr. crt	Tip membrana	$d_{med}$ , $\mu m$	cutt-off, Da	Flux AD, $l/m^2h$
1	P14.NMP.FO2413*	< 0,05	12.000	341,5
2	P15.NMP.FO2413*	< 0,05	10.000	301,9
3	P16.NMP.FO2413*	< 0,05	9.000	286,2
4	P18.NMP.FO2413*	< 0,05	8.000	269,3
5	AC16.NMP*	< 0,05	11.000	374,8
6	AC18.NMP*	< 0,05	7.000	243,1
7	AC20.NMP*	< 0,05	5.000	197,4

\*codificare pentru tipul membranelor preparate

Membranele de ultrafiltrare obtinute corespund conditiei de retinere a enzimelor, acestea avand in general mase moleculare mai mari de 12.000 Da.

In **concluzie** polimerii care au dat cele mai bune rezultate la prepararea membranelor de ultrafiltrare destinate imobilizarii enzimelor au fost polisulfona ULTRASON si monoacetatul de celuloza.

## **CAP.5. IMOBILIZAREA ENZIMELOR PE SUPORTURI POLIMERICE II CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICA A MEMBRANELOR CU ENZIME IMOBILIZATE**

Pentru imobilizarea enzimelor pe membrane, prin legare, in stare insolubila, s-au utilizat suporturile membranare activate selectionate in etapa anterioara.

Imobilizarea enzimelor in stare solubila s-a realizat cu ajutorul membranelor de ultrafiltrare preparate din polimerii: polisulfona ULTRASON (PSF) si acetat de celuloza (AC).

Au fost luate in studiu urmatoarele enzime:

- $\alpha$ -amilaza -  $\alpha$ -A (Merck, din *Bacillus subtilis*, produs liofilizat, 130U/mg);
- amiloglucozidaza - AMG (Merck, din *Aspergillus niger*, produs liofilizat, 75U/mg);
- ureaza - U (Merck, produs liofilizat, 5U/mg);
- invertaza - I (Sigma, din drojdie, granule, 43U/mg).

Imobilizarea enzimelor s-a realizat prin **legare covalenta** pe membrane activate, in doua variante (imobilizare pe membrane formate si imobilizare pe polimer activat si apoi formarea membranei) si prin **adsorbție**, urmata de reticulare, pe membrane obtinute din polimeri inertii.

In stare solubila, enzimele au fost imobilizate in module echipate cu membrane de ultrafiltrare, al caror cut-off este mai mic decat masa moleculara a biocatalizatorului.

Membranele cu enzime imobilizate in stare legata au fost caracterizate structural si din punct de vedere hidrodinamic prin aceleasi metode descrise in capitolul 4. Unele dintre membranele obtinute au fost caracterizate si prin microscopie electronica cu baleiaj (SEM). Din punct de vedere al proprietatilor biocatalitice preparatele imobilizate au fost caracterizate prin determinarea activitatii enzimaticе, conform metodelor specifice fiecărei enzime.

Metodele utilizate sunt:

- Determinarea activitatii  $\alpha$ -amilazei dupa metoda NOVO;
- Determinarea activitatii amiloglucozidazice dupa metoda SUMZYME

- Determinarea activitatii ureazei cu reactiv NESSLER
- Determinarea activitatii invertazei cu reactiv dinitrosalicilic

### 5.1. Imobilizarea enzimelor prin legare covalenta pe membrane activate

In experimente au fost utilizate membrane fara suport, obtinute prin procesul inversiei de faza, tehnica imersie-precipitare, din polimerii activati. Membranele realizate din polimerii PSF-AM, PSF-AF, PSF-FE, indiferent de concentratia solutiilor polimerice si a adjuvantilor din compozitia acestora, sunt friabile si nu pot fi utilizate in procesul de imobilizare a enzimelor. De aceea au fost realizate membrane din polimerii mentionati, in amestec cu polisulfona ULTRASON din care au fost obtinuti, in diverse proportii si anume:

M1 - membrana din PSF-AM/ PSF, raport masic 2:3, solutie 15% in NMP

M2 - membrana din PSF-AF/ PSF, in raport masic 2:3, 15% in NMP

M3 - membrana din PSF-FE/ PSF, in raport masic 2:3, 15% in NMP

De asemenea s-au utilizat membrane obtinute din solutii de concentratie 15% PPO-Br cu grad de bromurare de 26%, 27% si 28%:

M4 - membrana din PPO-Br, grad bromurare 26%, solutie 15% in NMP

M5 - membrana din PPO-Br, grad bromurare 27%, solutie 15% in NMP

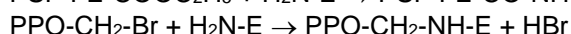
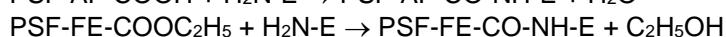
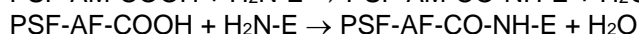
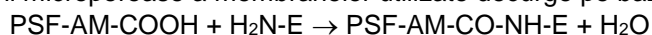
M6 - membrana din PPO-Br, grad bromurare 28%, solutie 15% in NMP

Caracteristicile structurale si hidrodinamice ale membranelor utilizate in experimente sunt prezentate in tabelul nr.42.

Tabel nr.42 **Caracteristicile structurale si hidrodinamice ale membranelor functionalizate**

Nr.crt.	Tip membrana	Cut-off Da	Flux apa distilata (l/m <sup>2</sup> h)
1	M1	18.000	740
2	M2	20.000	860
3	M3	19.000	768
4	M4	25.000	904
5	M5	26.000	920
6	M6	28.000	955

Imobilizarea enzimelor prin legare covalenta de gruparile active de la suprafata sau din interiorul structurii microporoase a membranelor utilizate decurge pe baza urmatoarelor reactii:



Experimentele s-au desfasurat intr-o instalatie de laborator prezentata in figura nr. 43, conform modului de lucru descris mai jos.

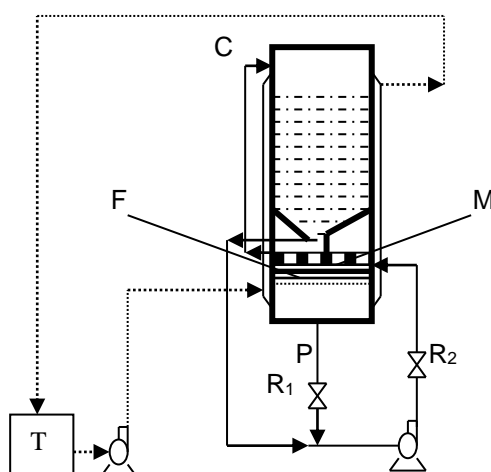


Fig. nr. 86 **Instalatie de laborator pentru imobilizarea enzimelor prin legare covalenta de membrane**

Legenda:

- M – membrana cu enzima imobilizata
- F – frita pentru sustinerea membranei
- C – concentrat
- P – permeat
- T – vas termostatat

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> – robineti

Fazele principale ale acestui proces de imobilizare sunt prezentate in figura nr. 87.

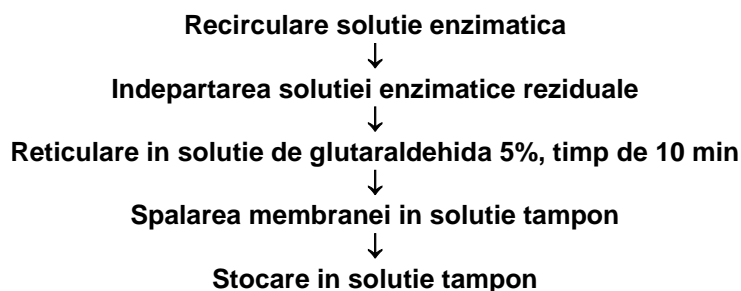


Fig. nr. 87. Fazele procesului de imobilizare a enzimelor pe membrane, prin legare covalenta

### Rezultate si comentarii

Eficienta procesului de imobilizare a enzimelor pe membrane se urmareste prin determinarea activitatii enzimatice specifice a preparatului imobilizat ( $U/cm^2$ ) si a randamentului global de mentinere a activitatii enzimatice (%). Randamentul global de mentinere a activitatii enzimatice se determina din relatia de bilant:

$$U_{T,i} = U_{T,m} + U_{T,sf} + U_{T,pi}$$

unde:  $U_{T,i}$  = unitati enzimatice totale din solutia initiala;  $U_{T,m}$  = unitati enzimatice totale in membrana;  $U_{T,sf}$  = unitati enzimatice totale din solutia finala;  $U_{T,pi}$  = unitati enzimatice totale pierdute prin inactivare.

Unitatile enzimatice totale pentru solutii se determina din produsul dintre activitatea enzimatica a acestora si volumul lor, iar pentru membrane, din produsul activitatii enzimatice specifice si suprafata acestora. Randamentul global de mentinere a activitatii enzimatice este definit prin relatia:

$$\eta = (U_{T,m} + U_{T,sf}) \times 100 / U_{T,i}$$

Rezultatele experimentarilor sunt prezentate sintetic in tabelul nr.43:

Tabel nr 43. Activitatile enzimatice specifice si randamentul de mentinere a activitatii enzimatice pentru enzimele imobilizate pe membrane

Tip membrana	Tip enzima	Activitate enzimatica specifica, E.U./cm <sup>2</sup>	Randament de mentinere a activitatii enzimatice
<b>M1 PSF-AM</b>	$\alpha$ -A	2,89	62,5
	AMG	2,67	57,8
	U	3,01	68,5
	I	1,93	46,9
<b>M2 PSF-AF</b>	$\alpha$ -A	3,24	73,1
	AMG	3,15	76,4
	U	3,32	79,3
	I	2,14	65,4
<b>M3 PSF-FE</b>	$\alpha$ -A	1,14	35,6
	AMG	1,49	41,3
	U	1,26	38,6
	I	1,62	51,6
<b>M4 PPOBr 26%</b>	$\alpha$ -A	4,25	89,7
	AMG	4,65	90,2
	U	3,64	71,3
	I	4,78	91,3
<b>M5 PPOBr 27%</b>	$\alpha$ -A	4,64	90,8
	AMG	4,91	91,6
	U	3,72	72,3
	I	5,14	92,6
<b>M6</b>	$\alpha$ -A	4,82	91,3
	AMG	5,26	93,8

<b>PPOBr 28%</b>	<b>U</b>	3,84	73,6
	<b>I</b>	5,31	94,1

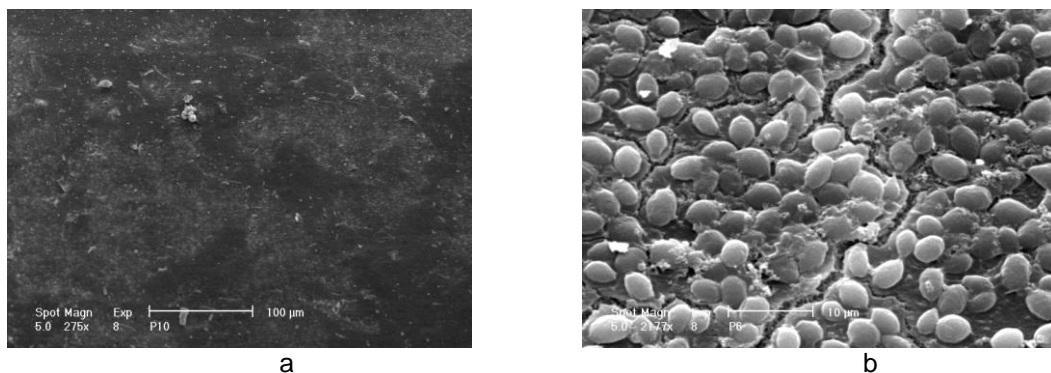
Asa cum reiese din tabelul nr. 43 enzimele se imobilizeaza prin legare covalenta pe membrane activate, printr-un proces de ultrafiltrare urmata de reticulare, cu randamente de mentinere a activitatii enzimatice diferite, in functie de natura suportului si a enzimei.

Cele mai bune randamente de imobilizare se obtin cu membranele pe baza de PPO-Br, M4, M5 si M6. Explicatia consta in faptul ca resturile de tip  $\text{CH}_2\text{-Br}$  sunt foarte reactive, interactionand cu grupele nucleofile de tip  $\text{-NH}_2$  existente in structura enzimelor. Dintre enzime, doar ureaza se imobilizeaza intr-o masura mai mica, fapt care denota ca aceasta metoda nu este cea mai indicata pentru enzima respectiva. Este foarte probabil ca aceasta enzima sa contina un numar mic de grupari reactive accesibile sau, in procesul de imobilizare, sunt blocate partial grupari existente in structura centrului catalitic.

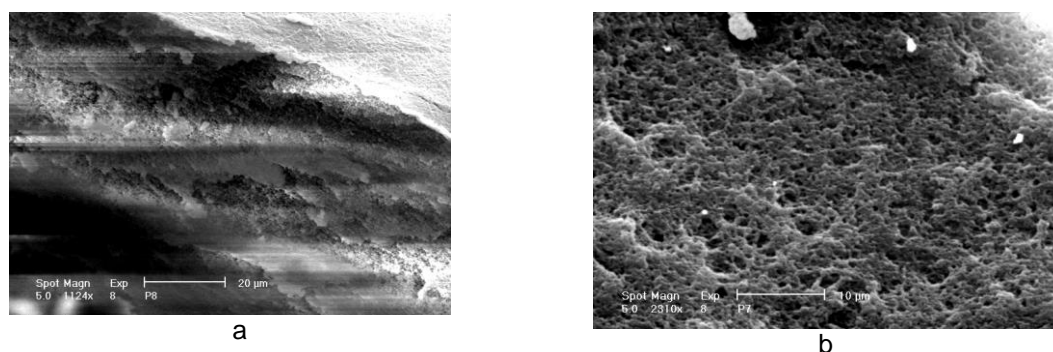
Comparand rezultatele obtinute pentru membranele M4, M5 si M6, se constata ca o data cu cresterea gradului de bromurare si implicit a capacitatii de retinere a biocatalizatorilor, are loc si cresterea corespunzatoare a randamentului de mentinere a activitatii enzimatice, acesta situandu-se in majoritatea cazurilor peste 90%.

In cazurile enzimelor imobilizate pe membrane activate prin acilare gradul de imobilizare scazut este pus pe seama reactivitatii mai scazute a gruparilor carboxil sau de tip esteric. De altfel, in aceasta ultima situatie s-au inregistrat cele mai scazute randamente de imobilizare. Din acest motiv, in experimentele ulterioare s-a utilizat ca suport de imobilizare polimerul PPO-Br.

Structurile membranelor M6 cu si fara invertaza imobilizata au fost evidentiata prin microscopie electronica SEM. In figurile nr. 88 si 89 sunt redade comparativ aceste structuri.



**Fig. nr. 88 Suprafata membranei M6**  
a) fara enzima    b) cu invertaza imobilizata



**Fig. nr. 89 Sectiune transversala prin membrana M6**  
a) fara enzima    b) cu invertaza imobilizata

Microgramele prezentate in figura nr. 88 evidentiaza modificarile care apar pe suprafata membranei M6, in urma imobilizarii de invertaza. Se observa ca moleculele de enzima sunt imobilizate pe intreg stratul activ superficial al membranei.

Din microgramele redade in figura nr. 89 reiese faptul ca enzima se imobilizeaza si in structura interna a membranei M6, fapt care conduce la o compactare a structurii microporoase membranare.

## 5.2. Imobilizarea enzimelor pe polimeri activasi ii formarea ulterioara a membranelor

Scopul experimentelor efectuate in aceasta varianta este de a obtine membrane cu enzime imobilizate in toata structura poroasa a acestora, spre deosebire de primul caz, in care acestea au fost retinute preponderent la suprafata.

Luandu-se in considerare rezultatele experimentelor prezentate in capitolul precedent, care denota o comportare superioara a polimerului PPO-Br la imobilizarea enzimelor, prin aceasta varianta au fost imobilizate pe polifenilenoxid bromurat cu grade de bromurare de 26, 27 si 28 %, urmatoarele enzime:  $\alpha$ -amilaza, amiloglucozidaza, invertaza.

### Rezultate si comentarii

Rezultatele experimentale obtinute in urma imobilizarii enzimelor mentionate pe PPOBr cu diferite grade de bromurare, in stare pulverulenta si sub forma de membrana, sunt prezentate in tabelul nr.44.

Tabel nr.44. **Rezultate experimentale la imobilizarea enzimelor pe PPOBr pulverulent si sub forma de membrana**

Tip polimer	Enzima	A.E. P-E, U /g	$\eta_1$ %	A.E. M, U /cm <sup>2</sup>	$\eta_2$ %	$\eta_T$ %
<b>PPO-Br 26%</b>	$\alpha$ -A	914	90,4	6,4	70,1	63,4
	AMG	993	91,5	6,9	69,5	63,6
	I	929	92,8	7,3	78,6	72,9
<b>PPO-Br 27%</b>	$\alpha$ -A	977	91,7	7,1	72,7	66,7
	AMG	1070	92,3	7,9	73,8	68,1
	I	1009	93,1	8,2	81,3	75,7
<b>PPO-Br 28%</b>	$\alpha$ -A	1053	93,6	7,5	71,2	66,6
	AMG	1131	94,2	8,3	73,4	69,1
	I	1056	95,3	8,5	80,5	76,7

unde:

P-E : complex polimer enzima;

M – membrana preparata din complexul polimer-enzima;

A.E. – activitatea enzimatica specifica;

$\eta_1$  – randament de mentinere a activitatii enzimaticice dupa imobilizarea pe polimer;

$\eta_2$  – randament de mentinere a activitatii enzimaticice dupa formarea membranei;

$\eta_T$  – randament total de mentinere a activitatii enzimaticice.

Prin tehnica descrisa mai sus se obtin membrane cu enzime imobilizate, a caror activitate catalitica specifica este mai mare comparativ cu membranele similare, utilizate in tehnica imobilizarii prin legare covalenta pe suprafata. Totusi, randamentul total al procesului este mult mai mic, datorita influentei solventului asupra preparatului enzimatic, in etapa de formare a membranei.

Metoda, este inferioara celei prezentate in capitolul anterior, ca urmare a randamentului total de imobilizare scazut. Membranele obtinute, avand o activitate enzimatica specifica mare, isi demonstreaza utilitatea in procese in care sunt transformate biocatalitic substraturi din solutii concentrate.

## 5.3. Imobilizarea enzimelor tn stare solubila prin ultrafiltrare

Studiul referitor la retinerea enzimelor in stare solubila pe suprafata unei membrane de ultrafiltrare a fost efectuat prin recircularea solutiilor apoase ale enzimelor  $\alpha$ -amilaza, amiloglucozidaza, ureaza si invertaza, pe membrane de ultrafiltrare realizate din polisulfona si respectiv, acetat de celuloza.

S-au luat in studiu membranele de ultrafiltrare obtinute pe instalatia cu functionare continua si anume:

MUF1 - P14.NMP.FO2413:	cut-off 12.000 Da
MUF2 - P15.NMP.FO2413:	cut-off 10.000 Da
MUF3 - P16.NMP.FO2413:	cut-off 9.000 Da
MUF4 - P18.NMP.FO2413:	cut-off 8.000 Da
MUF5 - AC16.NMP:	cut-off 11.000 Da
MUF6 - AC18.NMP:	cut-off 7.000 Da
MUF7 - AC20.NMP:	cut-off 5.000 Da

Au fost selectate aceste membrane, tinand seama de masele moleculare ale enzimelor studiate:

– $\alpha$ -amilaza: M=40.000 Da;

- amiloglucozidaza: M=70.000 Da
- ureaza: M=483.000 Da
- invertaza: M =270.000 Da.

Solutiile au fost trecute pe rundele din membranele respective, avand fiecare o suprafata membranara activa de 15 cm<sup>2</sup>, montate in instalatia prezentata in figura nr. 86.

Pentru a determina eficienta membranelor de ultrafiltrare la retinerea enzimelor, toate solutiile au fost recirculate pana la concentrarea biocatalizatorilor dupa un raport volumetric de 1:5.

La sfarsitul procesului s-au determinat activitatile enzimatiche ale permeatului si concentratului. Iinand seama si de activitatea enzimatica initiala a solutiei prelucrate, se determina gradul de retentie a enzimelor pe membrana de ultrafiltrare. Acesta este parametrul care caracterizeaza cel mai bine posibilitatea de imobilizare a enzimelor in celule de ultrafiltrare.

Pe parcursul fiecarui experiment a fost determinat fluxul mediu, acesta dand informatii despre comportarea hidrodinamica a membranelor de ultrafiltrare in procesele biocatalitice in care este implicata enzima imobilizata.

### Rezultate si comentarii

Datele experimentale acumulate in aceasta etapa sunt sintetizate in tabelele nr 45 – 51

Tabel 45. Rezultate obtinute la imobilizarea prin UF pe membrana MUF 1

Tip membrana	Cut-off Da	Enzima imobilizata	Flux l/m <sup>2</sup> h	Retentie enzima %
MUF 1	12.000	α-A	121	75,8
		AMG	113	79,3
		U	87	84,6
		I	92	82,7

Tabel 46. Rezultate obtinute la imobilizarea prin UF pe membrana MUF 2

Tip membrana	Cut-off Da	Enzima imobilizata	Flux l/m <sup>2</sup> h	Retentie enzima %
MUF 2	10.000	α-A	111	78,3
		AMG	103	82,9
		U	79	88,3
		I	81	86,5

Tabel 47. Rezultate obtinute la imobilizarea prin UF pe membrana MUF 3

Tip membrana	Cut-off Da	Enzima imobilizata	Flux l/m <sup>2</sup> h	Retentie enzima %
MUF 3	9.000	α-A	103	77,5
		AMG	96	81,6
		U	77	89,1
		I	78	88,5

Tabel 48. Rezultate obtinute la imobilizarea prin UF pe membrana MUF4

Tip membrana	Cut-off Da	Enzima imobilizata	Flux l/m <sup>2</sup> h	Retentie enzima %
MUF 4	8.000	α-A	97	81,2
		AMG	90	85,9
		U	68	94,6
		I	71	90,3

Tabel 49. Rezultate obtinute la imobilizarea prin UF pe membrana MUF 5

Tip membrana	Cut-off Da	Enzima imobilizata	Flux l/m <sup>2</sup> h	Retentie enzima %
MUF 5	11.000	α-A	142	65,3
		AMG	123	69,1
		U	111	73,4
		I	114	71,6

Tabel 50. Rezultate obtinute la imobilizarea prin UF pe membrana MUF 6

Tip membrana	Cut-off Da	Enzima imobilizata	Flux l/m <sup>2</sup> h	Retentie enzima %
MUF 6	7.000	α-A	102	79,2
		AMG	97	81,6
		U	73	91,3
		I	78	88,2

Tabel 51. Rezultate obtinute la imobilizarea prin UF pe membrana MUF 7

Tip membrana	Cut-off Da	Enzima imobilizata	Flux l/m <sup>2</sup> h	Retentie enzima %
MUF 7	5.000	$\alpha$ -A	64	83,4
		AMG	51	86,5
		U	42	93,7
		I	49	91,4

Datele experimentale prezentate in tabelele de mai sus conduc la urmatoarele concluzii:

- gradele de retentie ale enzimelor imobilizate pe membranele de ultrafiltrare studiate sunt in concordanta cu masele lor moleculare pe de o parte, iar pe de alta parte sunt dependente de structura, tipul si valoarea de cut-off a membranelor;
- datorita caracterului lor hidrofob, membranele din polisulfona au fluxuri de permeat mai mici decat ale membranelor din acetat de celuloza (membrane hidrofile), in schimb, din acelasi motiv, prezinta grade de retentie superioare, la aceeasi valoare de cut-off; este posibil, ca datorita hidrofilicitatii, porii membranelor sa permita trecerea unor macromolecule de enzima in zonele de discontinuitate ale suprafetei.
- coreland valorile de flux cu gradele de retentie rezulta ca cele mai adecvate membrane pentru includerea in structura unor bioreactoare de tip celula de ultrafiltrare, in care enzima este imobilizata in stare solubila, sunt MUF 4, dintre membranele de polisulfona si MUF 6, dintre membranele de acetat de celuloza.

## CAP.6. STUDIUL PROCESORILOR ÎN CARE INTERVIN MEMBRANE CU ENZIME IMOBILIZATE

Pentru a evidenta actiunea biocatalitica a sistemelor membrana-enzima imobilizata, in diverse biotransformari enzimatice, au fost studiate experimental doua procese:

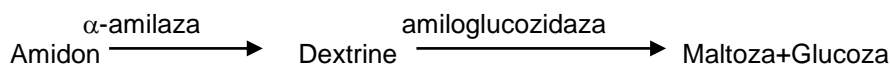
- hidroliza enzimatica a amidonului cu sistemul  $\alpha$ -amilaza-amiloglucozidaza imobilizate pe membrane prin legare covalenta;
- hidroliza enzimatica a zaharozei cu *invertaza* imobilizata in stare solubila in celula de ultrafiltrare.

De asemenea, a fost efectuat un studiu cinetic al procesului de zaharificare a maltodextrinei, utilizand amiloglucozidaza imobilizata pe membrane prin legare covalenta.

### 6.1. Hidroliza enzimatica a amidonului cu sistemul $\alpha$ -amilaza-amiloglucozidaza imobilizate pe membrane

Pentru efectuarea procesului s-au luat in studiu membranele de tip M6 (PPOBr 28%) cu  $\alpha$ -amilaza imobilizata, avand o activitate specifica de 4,82 U/cm<sup>2</sup> si respectiv, cu amiloglucozidaza imobilizata, avand o activitate specifica de 5,26 U/cm<sup>2</sup>.

Reactiile enzimatice care au loc in doua bioreactoare sunt de transformare a amidonului in dextrine (in primul bioreactor) si apoi in maltoza si glucoza (in al doilea bioreactor) sub actiunea  $\alpha$ -amilazei, respectiv amiloglucozidazei, conform schemei:



#### Rezultate si comentarii

In reactia de dextrinizare s-au utilizat 500 ml suspensie de amidon 30% SU cu pH=6,5. Temperatura de lucru a fost stabilita la 80°C. Solutia din primul bioreactor se recircula pana la obtinerea in permeat a unui echivalent in dextroza (DE) de cca. 12%. La atingerea acestui grad de dextrinizare solutia obtinuta este incarcata in al doilea bioreactor in care are loc zaharificarea. Se repeta operatia de dextrinizare cu un nou volum de suspensie de amidon in scopul determinarii parametrilor optimi. In primul set de experimente s-a urmarit determinarea presiunii optime de lucru, efectuandu-se 4 reactii de transformare a amidonului in dextrine, la presiunile de 2; 2,5; 3 si 3,5 bar. La fiecare experiment din acest set s-a utilizat o alta membrana cu  $\alpha$ -amilaza imobilizata, din acelasi polimer activat. Rezultatele sunt prezentate in tabelul nr. 52.

Intr-un al doilea set de experimente s-a urmarit determinarea timpului de utilizare al unei membrane cu enzima imobilizata. In acest scop au fost efectuate mai multe reactii de hidroliza enzimatica a amidonului, la presiunea optima stabilita in primul set de determinari, utilizand aceeasi membrana in toate ciclurile. S-a constatat ca in al 5-lea experiment de hidroliza a amidonului gradul de dextrinizare scade cu mai mult de

50% fata de primul, ceea ce denota o pierdere a activitatii enzimaticice prin denaturarea catalizatorului imobilizat.

Tabel nr. 52. Variatia fluxului si a echivalentului in dextroza al permeatului, functie de presiunea de lucru

Nr.crt.	Timp hidroliza, min	Flux, l/m <sup>2</sup> h	Presiune de lucru, bar	DE, %
0	1	2	3	4
1	15	62	2	5,2
		71	2,5	5,4
		82	3	5,7
		85	3,5	5,8
2	30	68	2	6,5
		79	2,5	6,6
		88	3	7,0
		92	3,5	7,1
3	45	74	2	7,7
		84	2,5	7,9
		93	3	8,2
		97	3,5	8,3
4	60	82	2	8,65
		91	2,5	8,9
		98	3	9,15
		102	3,5	9,2
5	75	90	2	9,45
		101	2,5	9,7
		105	3	10
		108	3,5	10
6	90	99	2	10,15
		110	2,5	10,3
		114	3	10,9
		117	3,5	11,1
7	105	108	2	10,5
		119	2,5	10,8
		123	3	11,5
		127	3,5	11,6
8	120	117	2	10,8
		129	2,5	11,3
		132	3	11,9
		136	3,5	12,1

Asa cum rezulta din tabelul nr. 52 se constata ca odata cu cresterea presiunii de lucru are loc atat o crestere a fluxului, cat si a gradului de transformare a amidonului (DE). Acest aspect este in concordanta cu faptul ca la presiune mai ridicata substratul (amidonul si derivatii de hidroliza) este recirculat de mai multe ori prin membrana si pus in contact un timp mai lung cu enzima imobilizata. Totusi la o presiune de peste 3 bar atat fluxul cat si gradul de transformare nu mai prezinta cresteri semnificative. In concluzie presiunea optima de lucru este de 3 bar.

De asemenea experimentele efectuate au pus in evidenta faptul ca dupa fiecare utilizare a enzimei imobilizate are loc o scadere a fluxului si a gradului de transformare a amidonului atat datorita colmatarii membranei cat si inactivarii enzimei. Practic dupa 5 utilizari repetate procesul nu mai decurge in conditii economice, avand loc o scadere a gradului de transformare a amidonului de la 12,5% pana la 6,2%, ceea ce reprezinta o pierdere a activitatii enzimaticice de 50,4%.

Din primele reactii in care  $\alpha$ -amilaza a fost utilizata succesiv, se constata ca gradul de hidroliza impus de cca. 12% se atinge in cca 2 ore.

Procesul de zaharificare a solutiei obtinute in primul bioreactor (amestec de oligozaharide) este condus in cel de-al doilea bioreactor la temperatura de 60°C si un pH de 4,5 ajustat prin adaus de acid sulfuric. In mod similar cu primul proces solutia se recircula pana la obtinerea in permeat a unui grad de transformare (DE) de min. 90%.

Pentru determinarea parametrilor optimi de functionare a acestui bioreactor modul de lucru este asemanator cu cel anterior. Astfel, pentru determinarea presiunii optime de lucru s-a lucrat la presiunile de 2; 2,5, 3 si 3,5 bar, inregistrandu-se fluxurile si DE din 15 in 15 minute.

Pentru determinarea timpului total de utilizare a amiloglucozidazei imobilizate au fost efectuate mai multe experimente in care presiunea a fost mentinuta constanta la valoarea determinata in primul set ca fiind optima ( $p = 2,5$  bar). Dupa 4 reactii succesive de hidroliza, experimentele au fost oprite deoarece se constata ca in ultimul proces de zaharificare activitatea enzimatica scade sub 50% fata de valoarea initiala, in concordanta cu scaderea gradului de zaharificare. Rezultatele sunt prezentate in tabelul nr. 55.

Tabelul nr. 55 **Determinarea timpului de utilizare a amiloglucozidazei imobilizate ( $p=2,5$ bar)**

Nr. crt.	Timp hidroliza, min	Flux, l/m <sup>2</sup> h	Nr. ciclu hidroliza	DE, %
0	1	2	3	4
1	15	144	1	36,2
		139	2	33,9
		135	3	30,2
		133	4	27,4
2	30	151	1	57,8
		147	2	49,8
		142	3	39,7
		136	4	30,8
3	45	157	1	75,9
		153	2	67,2
		148	3	58,4
		138	4	32,6
4	60	171	1	85,1
		164	2	77,3
		155	3	70,1
		140	4	40,6
5	75	183	1	92,1
		177	2	87,6
		160	3	72,4
		143	4	44,8
6	90	192	1	93,4
		187	2	89,2
		164	3	74,1
		145	4	45,9

In mod asemanator cu procesul de dextrinizare si in cazul zaharificarii o data cu cresterea presiunii de lucru are loc atat o crestere a fluxului de sirop de maltoza si glucoza rezultat, cat si a gradului de zaharificare. Datele obtinute pun in evidenta ca cea mai puternica variatie a celor doi parametri se inregistreaza la marirea presiunii de la 2 la 2,5 bar. In cazul maririi presiunii de lucru la 3 si respectiv 3,5 bar cresterile sunt mici si in concluzie se alege ca presiune optima de lucru cea de 2,5 bar.

Gradul de zaharificare impus de minim 90% se atinge deja in prima reactie de hidroliza dupa 75 min. Cu cat timpul de hidroliza se mareste, cu atat gradul de transformare creste ajungand la presiunea de 2,5 bar pana la valoarea de 93,2% dupa 90 de min.

Datele din tabelul nr. 55 demonstreaza ca numarul optim de utilizari repetate a membranelor cu amiloglucozidaza imobilizata este de 3. La a patra folosire are loc o scadere puternica a gradului de zaharificare mai ales in ultimele ore de hidroliza, acesta ajungand la o valoare de 49% din gradul de transformare corespunzator primei utilizari. Scaderea se datoreaza atat colmatarii membranei, cat si inactivarii enzimei imobilizate. Colmatarea membranei este pusa in evidenta de scaderea fluxului dupa fiecare reactie de hidroliza, iar inactivarea enzimei imobilizate de atingerea unui palier in evolutia gradului de zaharificare.

## 6.2. Studiul cinetic al procesului de zaharificare a maltodextrinei, utilizand amiloglucozidaza imobilizata pe membrane prin legare covalenta.

Parametrii biocatalitici ai membranei care a fost utilizata in procesul de hidroliza a amidonului si anume M6 (PPOBr 28%), cu o activitate enzimatica amiloglucozidazica de 5,26 U/cm<sup>2</sup>, au fost determinati in experimentele prezentate in continuare.

Pentru studiul cinetic al reactiei enzimatice s-a plecat de la ecuatia Michaelis-Menten. Viteza reactiei enzimatice este:

$$v = v_{\max} / (K_M/S + 1)$$

Aceasta ecuatie a permis determinarea valorilor  $v_{\max}$  si  $K_M$  pe baza variatiei vitezei initiale de reactie prin modificarea concentratiei de substrat.

Ecuatia de mai sus a fost linearizata sub forma ecuatiei Eadie-Hofstee:

$$v = v_{\max} - K_M \cdot v / S$$

Din reprezentarea grafica pentru fiecare set de experimente a dependentei  $v=f(v/C_s)$  se obtine valoarea vitezei maxime prin intersectia dreptei obtinute cu axa ordonatei si respectiv valoarea constantei Michaelis-Menten ( $K_M$ ) din panta dreptei respective.

Pentru punerea in evidenta a activitatii enzimaticice a enzimei imobilizate si pentru determinarea parametrilor cinetici s-a utilizat ca substrat maltodextrina (MD) cu un echivalent in dextroza (DE) de 20%, obtinuta prin hidroliza controlata a amidonului cu ajutorul enzimei  $\alpha$ -amilaza.

Viteza de reactie pentru fiecare experiment in parte s-a determinat prin masurarea concentratiei de zaharuri reducatoare totale obtinute dupa realizarea hidrolizei enzimaticice a MD cu enzima imobilizata. In cadrul fiecarui experiment hidroliza s-a realizat la acelasi pH (5,5) si in acelasi timp de reactie (30 min.). Variabilele au fost temperatura de reactie (40 - 65°C) si concentratia de substrat (50 - 350 g/l). S-a utilizat aceasta exprimare a concentratiei datorita imposibilitatii determinarii masei moleculare medii a MD obtinute. Acesta este si motivul pentru care unitatea de masura a  $K_M$  este g/l.

Ecuatia de mai sus a fost linearizata sub forma ecuatiei Eadie-Hofstee:

$$v = v_{\max} - K_M \cdot v / S$$

Din reprezentarea grafica pentru fiecare set de experimente a dependentei  $v=f(v/C_s)$  se obtine valoarea vitezei maxime prin intersectia dreptei obtinute cu axa ordonatei si respectiv valoarea constantei Michaelis-Menten ( $K_M$ ) din panta dreptei respective.

Pentru punerea in evidenta a activitatii enzimaticice a enzimei imobilizate si pentru determinarea parametrilor cinetici s-a utilizat ca substrat maltodextrina (MD) cu un echivalent in dextroza (DE) de 20%, obtinuta prin hidroliza controlata a amidonului cu ajutorul enzimei  $\alpha$ -amilaza.

Viteza de reactie pentru fiecare experiment in parte s-a determinat prin masurarea concentratiei de zaharuri reducatoare totale obtinute dupa realizarea hidrolizei enzimaticice a MD cu enzima imobilizata. In cadrul fiecarui experiment hidroliza s-a realizat la acelasi pH (5,5) si in acelasi timp de reactie (30 min.). Variabilele au fost temperatura de reactie (40 - 65°C) si concentratia de substrat (50 - 350 g/l). S-a utilizat aceasta exprimare a concentratiei datorita imposibilitatii determinarii masei moleculare medii a MD obtinute. Acesta este si motivul pentru care unitatea de masura a  $K_M$  este g/l.

Rezultatele experimentale sunt prezentate detaliat in teza in tabelele nr 56 – 61 si figurile nr. 91- 95. Spre exemplificare in tabelul nr. 60 si respectiv figura nr. 95 este prezentata variatia vitezei de reactie in functie de concentratia substratului la temperatura de 60°C.

Tabel nr. 60 **Variatia vitezei de reactie in functie de concentratia substratului ( $C_s$ ) la 60°C**

(enzima: AMG imobilizata; substrat: MD; timp de reactie: 30 min; pH: 5,5)

Nr. crt.	$C_s$ (g/l)	Zaharuri reducatoare totale initiale exprimate ca glucoza (mol/l)	Zaharuri reducatoare totale finale exprimate ca glucoza (mol/l)	$v \times 10^5$ (mol/l·s)	$v/C_s \times 10^7$ (mol/g·s)
1	50	0,055	0,211	8.667	17.334
2	100	0,111	0,384	15.167	15.167
3	150	0,166	0,530	20.222	13.481
4	200	0,222	0,657	24.167	12.084
5	250	0,277	0,776	27.722	11.089
6	300	0,333	0,881	30.444	10.148
7	350	0,388	0,978	32.778	9.365

Din datele obtinute si redate in tabelul nr. 60 s-a trasat graficul  $v = f(V/C_s)$  (figura nr.95)

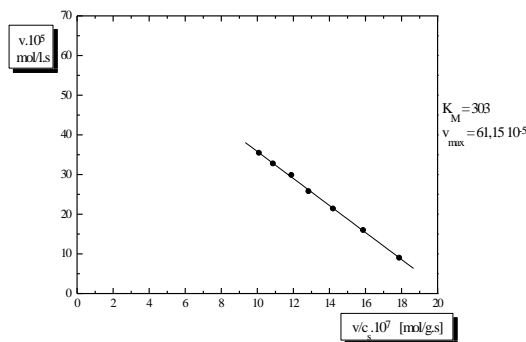


Fig. nr. 95. Variatia vitezei de reactie functie de concentratia de substrat la 60°C

Pe baza datelor din tabele si a graficelor corespunzatoare au fost calculate valorile  $v_{max}$  si  $K_M$  acestea fiind prezentate in tabelul nr. 62. Intra-un ultim experiment au fost determinati parametrii cinetici ai enzimei solubile, la temperatura optima de actiune a enzimei, de 60°C.

Tabel nr. 62 Valorile parametrilor cinetici ( $v_{max}$  si  $K_M$ ) ai amiloglucozidazei (AMG) imobilizate si solubile, la diverse temperaturi

Tipul enzimei	T (°C)	$v_{max} \times 10^5$ (mol/l.s)	$K_M$ (g/l)
AMG - imobilizata	40	8,604	88,3
	45	12,52	113,2
	50	21,02	162
	55	36,31	220,5
	60	61,15	303
	65	69,814	340,1
AMG - solubila	60	48,5	163,4

Rezultatele experimentale obtinute pun in evidenta faptul ca viteza de reactie creste pe de o parte cu cresterea concentratiei substratului, iar de pe alta parte cu cresterea temperaturii de reactie.

Viteza de reactie creste puternic la valori mici ale concentratiei substratului, ajungand ca la valori foarte mari ale acestui parametru sa se atinga un palier (viteza ramane constanta). De asemenea, la temperaturi mari (60-65°C) viteza de reactie este de aproximativ 2-3 ori mai mare decat cea pentru temperatura de 40°C.

Datele din tabelul 62 demonstreaza faptul ca enzima imobilizata are cei doi parametri cinetici ( $v_{max}$  si  $K_M$ ) mai mari decat enzima in stare solubila.

### 6.3. Hidroliza enzimatica a zaharozei cu invertaza imobilizata tn stare solubila tn celula de ultrafiltrare

Pentru punerea in evidenta a importantei si utilitatii membranelor cu enzime imobilizate s-a studiat posibilitatea aplicarii practice a acestora. Dintre cele doua variante de enzime imobilizate pe membrane si anume, legate pe suprafata sau in microstructura membranei, respectiv in stare libera, in celule de ultrafiltrare, a fost aleasa cea de a doua, din considerente care tin de limitarea fenomenelor de difuzie. Astfel, a fost realizat un modul de ultrafiltrare in sistem de curgere tangentiala, echipat cu membrane de ultrafiltrare din polisulfona depusa pe suport textil. Membrana utilizata a fost obtinuta pe instalatia cu functionare continua dintr-o solutie de concentratie 20% in polimer, cu adaus de adjuvanti, (dupa cum s-a prezentat in capitolul 4) si a avut un flux normalizat de 620 l/m<sup>2</sup>h.

Delimitarea celor trei zone – structura microporoasa / structura macroporoasa / suport este pusa in evidenta prin microscopie SEM, micrograma acesteia fiind prezentata in figura nr. 97.

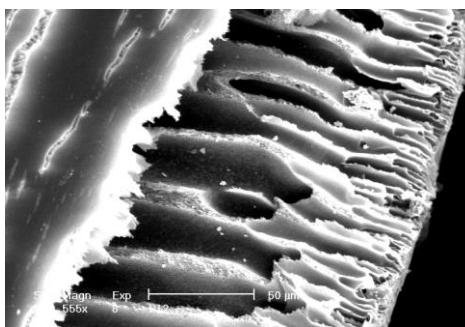


Fig. nr. 97. Micrograma membranei de ultrafiltrare, din polisulfona

Pe membranele de ultrafiltrare a fost immobilizata in stare solubila enzima **invertaza**, obtinuta prin prelucrarea extractelor de drojdie, avand o activitate enzimatica initiala de 30000 U/ml.

In figura nr. 98 este prezentat modul de UF destinat imobilizarii invertazei in stare solubila si hidrolizei enzimaticе a zaharozei la zahar invertit, membranele avand o suprafata filtranta totala de 0,4 m<sup>2</sup>.



Fig. nr. 98. Modul de UF

Dupa montarea membranelor de ultrafiltrare in structura modului, acesta se pune in legatura cu un vas de alimentare in care se introduc solutia de zaharoza si enzima solubila, sub agitare continua. Solutia de zaharoza, de concentratie 20%, este alimentata in mod continuu cu un debit egal cu cel al permeatului (solutie de zahar invertit), in timp ce cantitatea de enzima retinuta la suprafata membranelor si recirculata in vasul de alimentare ramane constanta.

Vasul in care a avut loc hidroliza enzimatică s-a alimentat cu un debit de 50 l/h de solutie de zaharoza, iar volumul de enzima cu activitatea mentionata a fost de 3 ml. S-a determinat gradul de hidroliza prin dozarea glucozei in permeat, la intervale de 30 min. Pe tot parcursul procesului temperatura a fost mentinuta la 40°C.

#### Rezultate si comentarii

Rezultatele obtinute pe parcursul procesului de hidroliza enzimatică sunt prezentate in tabelul nr. 63.

Tabel nr. 63. Variatia gradului de hidroliza a zaharozei cu invertaza solubila imobilizata pe membrane de UF

Nr. crt.	Timp (min)	Grad de hidroliza (%)
1	30	98
2	60	96
3	90	94
4	120	91
5	150	88
6	180	85
7	210	81
8	240	77
9	270	72
10	300	66

Valorile inregistrate denota faptul ca, dupa 5 ore de functionare, enzima isi pierde o parte din capacitatea catalitica. Dupa acest interval de timp este necesara introducerea unui nou volum de 2 ml de enzima, pentru readucerea procesului in parametrii initiali. Practic, acesta este consumul de enzima pentru obtinerea a  $50 \times 5 = 250$  l zahar invertit de concentratie aproximativ egala cu cea a solutiei de zaharoza.

Pentru aceeasi cantitate s-ar fi consumat un volum de 15 ml de enzima, intr-un proces discontinuu, in care enzima ar fi fost utilizata fara a fi imobilizata.

Productivitatea mare a acestui bioreactor demonstreaza superioritatea tehnologiilor in care sunt utilizate enzimele imobilizate pe membrane.

Comparativ cu enzimele imobilizate prin legare pe membrane, cele retinute prin UF in stare solubila au avantajul prelucrării unor solutii concentrate de substrat.

## CONCLUZII GENERALE

In cadrul tezei de doctorat s-au abordat mai multe directii de lucru legate de imobilizarea enzimelor pe membrane. Aceste directii au fost:

- functionalizarea polimerilor in vederea obtinerii de membrane destinate imobilizarii enzimelor;
- selectarea membranelor activate si neactivate pentru imobilizarea enzimelor in stare insolubila si solubila;
- imobilizarea enzimelor prin legare covalenta pe membrane activate;
- imobilizarea enzimelor in stare solubila in celule de ultrafiltrare;
- caracterizarea fizico-chimica si structurala a membranelor cu enzime imobilizate;
- studiul membranelor cu enzime imobilizate, in stare insolubila si in stare solubila, in procese biocatalitice.

Concluziile desprinse din aceasta lucrare sunt:

1. Rapoartele optime pentru activarea polisulfonei prin reactii de acilare sunt:

acilare cu anhidrida maleica: 1 / 2,5 / 3  $\Rightarrow \eta_{\text{optim}} = 58,2 \%$

acilare cu anhidrida ftalica: 1 / 2,75 / 3,3  $\Rightarrow \eta_{\text{optim}} = 89,7 \%$

acilare cu cloroformiat de etil: 1 / 2,25 / 2,7  $\Rightarrow \eta_{\text{optim}} = 38,5 \%$

2. Varianta optima de bromurare a polifenilenoxidului este cea in care se utilizeaza polifenilenoxidul de productie indigena, bromsuccinimida ca reactant, azo-izo-butironitrilul ca initiator si tetraclorura de carbon ca solvent, intr-un raport de 1,2 / 1 / 0,05 prin adaugarea reactantilor in patru fractiuni egale.

3. Dintre polimerii activati prin acilarea polisulfonei au fost selectati pentru realizarea de membrane cu enzime imobilizate prin legare covalenta : polisulfona acilata cu anhidrida maleica (**PSF-AM**); polisulfona acilata cu anhidrida ftalica (**PSF-AF**); polisulfona acilata cu resturi esterice (**PSF-FE**).

4. Din gama polimerilor de tipul polifenilenoxid bromurat au fost retinuti pentru experimente de imobilizare cei cu un grad de bromurare mai mare de 25%.

5. Polimerii care au dat cele mai bune rezultate la prepararea membranelor de ultrafiltrare destinate imobilizarii enzimelor au fost polisulfona ULTRASON si monoacetatul de celuloza.

6. Solventul cel mai bun pentru dizolvarea polimerilor polisulfona ULTRASON si monoacetat de celuloza este N-metilpirolidona.

7. Cele mai bune randamente de imobilizare se obtin cu membranele pe baza de PPO-Br, M4, M5 si M6. Explicatia consta in faptul ca resturile de tip  $\text{CH}_2\text{-Br}$  sunt foarte reactive, interactionand cu grupele nucleofile de tip  $\text{-NH}_2$  existente in structura enzimelor.

8. In cazurile enzimelor imobilizate pe membrane activate prin acilare gradul de imobilizare scazut este pus pe seama reactivitatii mai scazute a gruparilor carboxil sau de tip esteric. Din acest motiv, in experimentele ulterioare s-a utilizat ca suport de imobilizare polimerul PPO-Br.

9. Gradele de retentie ale enzimelor imobilizate in stare solubila pe membrane de ultrafiltrare sunt in concordanta cu masele lor moleculare pe de o parte, iar pe de alta parte sunt dependente de structura, tipul si valoarea de cut-off a membranelor.

10. Datorita caracterului lor hidrofob, membranele din polisulfona au fluxuri de permeat mai mici decat ale membranelor din acetat de celuloza (membrane hidrofile), in schimb, din acelasi motiv, prezinta grade de retentie superioare, la aceeasi valoare de cut-off; este posibil, ca datorita hidrofilicitatii, porii membranelor sa permita trecerea unor macromolecule de enzima in zonele de discontinuitate ale suprafetei.

11. Coreland valorile de flux cu gradele de retentie rezulta ca cele mai adecvate membrane pentru includerea in structura unor bioreactoare de tip celula de ultrafiltrare, in care enzima este imobilizata in stare solubila, sunt MUF 4, dintre membranele de polisulfona si MUF 6, dintre membranele de acetat de celuloza.

12. In procesul de dextrinizare a amidonului cu  $\alpha$ -amilaza imobilizata pe membrane prin legare covalenta, dupa 5 utilizari succesive procesul nu mai decurge in conditii economice, avand loc o scadere a gradului de transformare a amidonului de la 12,5% pana la 6,2%, reprezentand o pierdere a activitatii enzimatic de 50,4%.

13. Numarul optim de utilizari repetate a membranelor cu amilglucozidaza imobilizata legata covalent, in procesul de zaharificare a dextrinelor, este de 3.

14. Din studiile cinetice efectuate cu amilglucozidaza imobilizata pe membrane in procesul de zaharificare a dextrinelor rezulta ca viteza de reactie creste puternic la valori mici ale concentratiei substratului, ajungand ca la valori foarte mari ale acestui parametru sa se atinga un palier (viteza ramane constanta). De asemenea, la temperaturi mari (60-65°C) viteza de reactie este de aproximativ 2-3 ori mai mare decat la temperatura de 40°C.

15. Rezultatele obtinute demonstreaza faptul ca enzima imobilizata are cei doi parametri cinetici ( $v_{max}$  si  $K_M$ ) mai mari decat enzima in stare solubila.

16. Comparativ cu enzimele imobilizate prin legare pe membrane, cele retinute prin ultrafiltrare in stare solubila au avantajul prelucrarii unor solutii concentrate de substrat.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVA

1. Dumitru, I.F., Iordachescu, D. – Introducere in Enzimologie, Editura Medicala, Bucuresti, (1981);
2. Wiseman, A. – Handbook of Enzyme Biotechnology, Ed. 2, Chichester, England, (1985);
3. Chibata, I., Wingard, L.B.J. – Immobilized Microbial Cells, vol.4, New York, Academic Press (1983);
4. Vasilescu, I. – Enzimele, Editura Academiei, Bucuresti (1961);
5. Zarnea, G., Mencinicopschi, Gh., Bragarea, Tt. – Bioingineria preparatelor enzimatic microbiene, Ed. Tehnica, Bucuresti (1980);
6. **Batrinescu, Gh.**, Stoica, M., Albinescu, D., Solcan, E. – Cercetari pilot pentru obtinerea complexului enzimatic celulozolic, Al III-lea Congres National de Chimie, Bucuresti (1988);
7. Stoica, D., Solcan, E., **Batrinescu, Gh.**, Iga, S., Balauta, E., Albinescu, D. – Biotehnologiile enzimatic in industria alimentara elaborate de Institutul de Chimie Alimentara, Simpozionul de Microbiologie Industriala si Biotehnologie, Iasi (1989);
8. Roman, G., **Batrinescu, Gh.**, Garganciu, D., Albu, B. – Ultrafiltrarea extractelor de Saccharomyces cerevisiae pentru obtinerea de invertaza pura, Al VII-lea Simpozion de Chimia Coloizilor si Suprafetelor, Bucuresti (2002);
9. Garganciu, D., **Batrinescu, Gh.**, Docu, N. – Separarea, purificarea si concentrarea enzimelor prin ultrafiltrare, A VIII-a Conferinta de Chimie Fizica, Bucuresti (1996);
10. Garganciu, D., **Batrinescu, Gh.**, Roman, G., Nita, O., Albu, B.G. - Polysulfone and functionalized polysulfone activated membranes for proteins purification, Journal of the Romanian Colloid and Surface Chemistry Association, in press.;
11. Nakajima, M., Nishizawa, K., Nabetani, H.A. – Bioproc. Eng. 9, 31 (1993);
12. Yamamoto, K., Tosa, T., Chibata, I. - Biotechnol. Bioeng., 22, 2045 (1980);
13. Ginalska, G., Belcarz, A., Lobarzewski, J., Wolski, T. – Biotechnologia, 1144, 226 (1999);
14. Takahashi, H., Li, B., Sasaki, T., Miyazaki, C., Kajino, T., Inagaki, K. – Microporous and Mesoporous Materials, 44-45, 755 (2001);
15. Bahuleker, R., Ayyangar, N.R., Ponrathanam, S. – Enzyme Microb. Technol., 13, 858 (1991);
16. Godbde, S.S., Kubal, B.S., D'Souza, S.F. – Enzyme Microb. Technol., 12, 214 (1990);
17. Bilitewski, U., Jäger, A., Rüger, P., Weise, W. – Sensors and Actuators B, 15-16, 113 (1993);
18. D'Souza, S.E., Altekar, W., D'Souza, S.F. – World J. Microbiol. Biotechnol., 13, 561 (1997);
19. Melo, J.S., Kubal, B.S., D'Souza, S.F. – Food Biotechnol., 6, 175 (1992);
20. **Batrinescu, Gh.**, Stoica, Istrate, E. – Cercetari pentru obtinerea unui preparat de glucoamilaza imobilizata, Sesiunea de Comunicari a Institutului de Chimie Alimentara, Bucuresti (1992);
21. Huckel, M., Wirth, H.J., Hearn, M.T. – J. Biochem. Biophys. Methods, 31, 165 (1996);
22. Huang, X.L., Catignani, G.L., Swaisgood, H.E. – J. Biotechnol., 53, 21 (1997);
23. De Filipi, L.J. – U.S. Patent 4229536 (1980);
24. Husaim, S., Jafri, F. – Biochem. Mol. Biol. Int., 36, 669 (1995);
25. D'Urso, E.M., Fortier G. – Enzyme Microb. Technol., 18, 482 (1996);
26. Melo, J.S., D'Souza, S.F. – Appl. Biochem. Biotechnol., 32, 159 (1992);
27. Yang, Y., Chase, H.A. – Biotechnol. Appl. Biochem. 2, 145 (1998);
28. Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. – Enzyme Microb. Technol., 26(7), 509 (2000);
29. Juraj, Z., Josef, A. – Czechoslovakya Patent, 189472 (1981);
30. Shahani, K.M., Wagner, F.W., Kilara, A. – U.S. Patent 4279998 (1981);

31. Krajewska, B. et al. – J. Chem. Technol. Biotechnol., 48, 337 (1990);
32. Jeffrey, A. et al. – J. Membr. Sci., 60, 75 (1991);
33. Porter, M.C. – Handbook of Industrial Membrane Technology, Noyes Publications (1990);
34. Costin, G.M., Florea, T. – Aplicatii ale Separarilor prin Membrane in Biotehnologii si Industria Alimentara, Ed. Academica, Galati (1997);
35. Kesting, R.E. – Synthetic Polymeric Membranes, Mc Groww –Hill, New York (1971);
36. Sourirajan, S. – Reverse Osmosis and Synthetic Membranes, National Research Council, Canada, Ottawa (1977);
37. Dima, R. Plesu, V., Giju, C.L., - Ingineria Separarilor cu Membrane, Ed. Bren, Bucuresti (1999);
38. Ray, R.J., Krantz, W.B., Sani, R.L. – J. Membr.Sci., 23, 155 (1985);
39. Mulder, M. – Basic Principles of Membrane Technology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1991);
40. **Batrinescu, Gh.**, Dumitrescu, M., Popescu, G. Banut, D., Stockel, S., Pordea, V. – Brevet de inventie 115143C (1999);
41. Albu, B.G., Roman, G., Tablet, C., **Batrinescu, Gh.**, Popescu, G., Pirvulescu, V. – Composite membranes with mesoporous silica and their utilization, Proceeding of Advanced materials and their characterization, JINR – Romanian Workshop, Dubna, Rusia (2002);
42. Mc Lain, E.A., Mahon, H.I. – U.S. Pat., 3.423.491 (1969);
43. Mandru, I, Ceacareanu, D.M. – Chimia Coloizilor si Suprafetelor. Metode experimentale, Ed. Tehnica, Bucuresti (1976);
44. Bottino, A., Capanelli, G., Petit – Bon, P., Cao, N., Pegoraro, M., Zoia, G. – Sep. Sci. Technol., 26 (1991);
45. Mulder, M.H.V. – Pervaporation Membrane Separation Process, Huang, R.Y. (Ed.), Elsevier, Amsterdam (1991);
46. Hofmann, S. – Practical Surface Analysis, Briggs, D., Seah, M.P. (Ed.), Wiley, New York (1990);
47. Mc Gregor, W.C. (Ed.) – Membrane Separations in Biotechnology, Marcel Dekker, New York (1986);
48. Maselli, J.A. et al. – Can. Patent CA 1.204.018 (1982);
49. Popescu, G., **Batrinescu, Gh.**, Garganciu, D., Roman, G., Andrei, L., Diur, G., Mandru, A., Ivanova, V. – Studiarea membranelor preparate in Romania in vederea aplicarii lor in industria alimentara, Pomicultura, viticultura si vinificatia in R. Moldova, nr. 3, Chisinau (1998);
50. Gans, U., Denk, V. – Brauwelt, 40, 2000 (1994);
51. Tazi-Pain, A. et al. L'Eau, l'Industrie, les Nuisances nr. 146 (1991);
52. Salvat, D., Leborgne, R. – Techniques, Science, Methodes, 85, nr.10 (1990);
53. Harisson, R.G. (Ed.) – Protein Purification Processes Engineering, M. Dekker, New York (1993);
54. Zadow, J.G. – Whey and Lactose Processing, Elsevier Appl. Sci., Amsterdam (1992);
55. **Batrinescu, Gh.**, Garganciu, D., Roman, G., Albu, B.G. – The concentration of whey proteins by ultrafiltration, Revue Roumaine de Chimie, in press (2003);
56. Rautenbach, R., Albrecht, R. – Membrane Processes, Wiley, New York (1989);
57. \*\*\* OSMOTA – Membrane Systems, Osmota – Membrantechnik GmbH, Dizingen, Germany (1994);
58. Popescu, G., Terban, V., Pordea, V., Stockel, S., **Batrinescu, Gh.** – Brevet RO-115422 C1 (2000);
59. Popescu, G., Terban, V., **Batrinescu, Gh.**, Pordea, V., Stockel, S. – Brevet RO – 113438C1 (1998);
60. Radu, M., **Batrinescu, Gh.**, Arghirescu, M., Dinescu, M., Cioroianu, F. – Cerere de brevet nr. A/00684 (2003);
61. **Batrinescu, Gh.**, Popescu, G., Dragus, R.D., Burneci, C.Gh., Lehr, C., Pordea, V., Negre, F. – Cerere de brevet nr. A /00542 (2002);
62. Higuchi, A., Chida, S., Nakagawa, S. – J. Chem. Soc. Faraday Trans., 87 (17) (1991);
63. Kaetsu, I., Uchida, K., Sutani, K., Sakata, S. – Radiation Physics and Chemistry, 57, 3-6 (2000);
64. Garganciu, D., **Batrinescu, Gh.**, Popescu, G. – Membrane din polisulfona si polisulfona modificata si utilizarile lor, Conferinta de Chimie si Inginerie Chimica, Bucuresti (1995);
65. Ionescu, D., Barboiu, M., Nechifor, Gh., Popescu, G., **Batrinescu, Gh.** – Membrane din polisulfona pentru imobilizarea enzimelor, Conferinta Nationala de Chimie si Inginerie Chimica, Bucuresti (1993);
66. Turker, B., Yakup, M.A., Adil, D., Vasif, H. – Polymer International, 44, 4, (1997);
67. Tanioka, A., Yokoyama, Y., Miyasaka, K. – Journal of Colloid and Interface Science, 200, 1 (1998);
68. Yuan, X., Shen, N., Sheng, J., Wei, X. – J. Membr. Sci., 155, 1 (1999);
69. Ulbricht, M., Papra, A. – Enzyme Microb. Technol., 20, 1 (1997);
70. Ionescu, D., **Batrinescu, Gh.**, Popescu, G., Nechifor, Gh., Moise, L., Rata, D. – Membrane pentru imobilizarea biocatalizatorilor, A VII-a Conferinta de Chimie Fizica, Bucuresti (1994);
71. **Batrinescu, Gh.**, Garganciu, D., Stockel, S., Manea, C., Docu, N. – Imobilizarea enzimelor pe membrane polimerice, A VIII-a Conferinta de Chimie Fizica, Bucuresti (1996);
72. Kawai, T., Saito, K., Sugita, K., Sugo, T., Misaki, H. – J. Membr. Sci., 191, 1-2 (2001);
73. Uzunova, K., Vassilieva, A., Ivanova, B., Spasova, D., Tonkova, A. – Process Biochemistry, 37, 8 (2002);
74. Memori, R., Tsukada, Y. – U.S. Patent, 5015387 (1991);
75. Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. – Enzyme Microb. Technol., 26, 7 (2000);
76. Chen, J.P., Chiu, S.H. – Enzyme Microb. Technol., 26, 5-6 (2000);

77. Hicke, H.G., Ulbricht, M., Becker, M., Radosta, S., Heyer, A.G. – J. Membr. Sci., 161 (1999);
78. Tien, C.J., Chiang, B.H. – Process Biochemistry, 35, 3-4 (1999);
79. Cheetham, P.S.J. – Handbook of Enzyme Biotechnology, Ed Wiseman, A. Chichester –New York-Ontario-Brisbane, 105-106 (1985);
80. Sengupta, S., Modak, J.M. – Chemical Engineering Science, 56, 11 (2001);
81. **Batrinescu, Gh.**, Garganciuc, D., Roman, G., Lehr, C., Popescu, G. – Caracterizarea unor enzime imobilizate pe suporturi macromoleculare, Al VI-lea Simpozion de Chimia Coloizilor si Suprafetelor, Bucuresti (1998);
82. Curcio, S., Calabrò, V., Iorio, G. – J. Membr. Sci., 173, 2 (2000);
83. **Batrinescu, Gh.**, Garganciuc, D., Roman, G. – Enzymatic conversion with immobilized enzymes membranes, European Membrane Society, XVI Annual Summer School, Vezprem, Hungary (1999);
84. **Batrinescu, Gh.**, Garganciuc, D., Roman, G., Popescu, G. - Studiul conversiei amidonului si maltodextrinei utilizand amiloglucozidaza imobilizata pe membrane polimerice, "Zilele Chimiei Romanesti", Bucuresti (2001);
85. D'Souza, F.D., Kubal, B.S. – Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 51, 2 (2002);
86. Liang, J.F., Li, Y.T., Yang, V.C. – J. Pharm. Sci., 89, 979-990 (2000);
87. Erhan, E., Keskinler, B., Algur, O.F., Galip, A. – J. Membr. Sci., 206, 1-2 (2002).