



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2008 00696**

(22) Data de depozit: **11.09.2008**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29.11.2012** BOPI nr. 11/2012

(41) Data publicării cererii:
26.02.2010 BOPI nr. 2/2010

(73) Titular:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• BUCUR BOGDAN, STR.BIBESCU VODĂ
BL.P2C, SC.5, AP.6, PITEȘTI, AG, RO;
• BUCUR MĂDĂLINA PETRUȚA,
STR.CPT.ION BECLEANU NR.16, BL.C7,
SC.A, AP..8, CÂMPULUNG MUSCEL, AG,
RO;
• RADU GABRIEL LUCIAN,
ALEEA ROTUNDĂ NR.4, BL.H6, SC.D,
AP.61, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• RĂDULESCU CRISTINA,
B-DUL CEAHLĂUL NR.15, BL.75, SC.1,
AP.4, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
B. BUCUR, G.L. RADU, C.N. TOADER,
"ANALYSIS OF METHANOL-ETHANOL
MIXTURES FROM FALSIFIED
BEVERAGES USING A DUAL
BIOSENSORS AMPEROMETRIC SYSTEM
BASED ON ALCOHOL DEHYDROGENASE
AND ALCOHOL OXIDASE", EUR. FOOD
RES. TECHNOL., VOL. 226, PP. 1335-1342,
APR. 2008; L.V. SHKOTOVA, A.P.
SOLDATKIN, M.V. GONCHAR, W.
SHUHMANN, S.V. DZYADEVYCH,
"AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR
ETHANOL DETECTION BASED ON
ALCOHOL OXIDASE IMMOBILISED
WITHIN ELECTROCHEMICALLY
DEPOSITED RESYDROL FILM",
MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING
C, VOL. 26, PP. 411-414, 2006

(54) **METODĂ PENTRU DETERMINAREA CONCENTRAȚIILOR DE
METANOL ȘI ETANOL DIN AMESTECURI FĂRĂ
SEPARAREA ANALIȚILOR**



1 Invenția se referă la o metodă pentru determinarea concentrațiilor de metanol și
2 etanol din amestecuri fără separarea analiților.

3 Invenția se referă la o metodă ameliorată pentru determinarea concentrațiilor de
4 metanol și etanol, fiind utilizată, în special, la identificarea băuturilor alcoolice falsificate,
5 produse cu metanol sau amestec metanol+etanol în loc de etanol, prin determinarea
6 metanolului și etanolului, în domeniul de concentrații al amestecurilor: 0,005...0,2 mmol/L
7 metanol și 0,03...0,2 mmol/L etanol.

8 Sunt cunoscute metode pentru analiza amestecurilor de etanol și metanol utilizând
9 separarea celor doi analiți prin cromatografie de gaze sau lichide, și apoi cuantificarea cu
10 diferiți detectori. Cu toate că metodele cromatografice cunoscute permit o separare a celor
11 doi analiți, și determinarea acestora cu o rezoluție și limită de detecție suficiente, aceste
12 metode sunt complexe prin faptul că determinările trebuie efectuate utilizând aparatură
13 scumpă și sofisticată, aparatele nu sunt portabile, sunt necesari reactivi cu puritate foarte
14 înaltă, iar personalul trebuie să fie bine calificat.

15 L.V. Shkotova, A. P. Soldatkin, M. V. Gonchar, W. Shuhmann, S. V. Dzyadevych, în
16 lucrarea "Amperometric biosensor for ethanol detection based on alcohol oxidase
17 immobilised within electrochemically deposited Resydrol film", *Materials Science and*
18 *Engineering C*, vol. 26, pp. 411-414, 2006, menționează un biosenzor amperometric utilizat
19 pentru analiza etanolului din băuturi alcoolice, biosenzor bazat pe alcool oxidază (ADX)
20 imobilizată în film de Resydrol depus electrochimic, și pe detectarea peroxidului de hidrogen.
21 ADX a fost izolată și purificată dintr-o tulpină de *Hansenula polymorpha*.

22 Recent a fost raportată în literatură (B. Bucur, G.L. Radu, C.N. Toader, "Analysis of
23 methanol-ethanol mixtures from falsified beverages using a dual biosensors amperometric
24 system based on alcohol dehydrogenase and alcohol oxidase", *Eur. Food Res. Technol.*,
25 vol. 226, pp. 1335-1342, apr. 2008) o metodă simplă, ieftină, rapidă, portabilă, pentru deter-
26 minarea concentrațiilor de metanol și etanol din amestecuri, bazată pe măsurători
27 amperometrice utilizând, pentru aceeași probă, succesiv doi biosenzori enzimatici bazați
28 fiecare pe câte o enzimă: alcool dehidrogenaza (ADH, EC 1.1.1.1.) și alcool oxidaza (AOX,
29 EC 1.1.3.13). Principiul de detecție este bazat pe faptul că un biosenzor bazat pe ADH va
30 permite analiza doar a etanolului dintr-un amestec metanol+etanol, pe când răspunsul bio-
31 senzorilor bazați pe AOX este produs în special de către metanol, dar și de etanol. Această
32 metodă de analiză nu necesită etape îndelungate și complicate de separare a analiților, și
33 permit realizarea unor dispozitive portabile, dar selectivitatea măsurării metanolului și
34 etanolului în amestecuri nu este la fel de bună ca în cazul metodelor cromatografice. Metoda
35 enzimatică raportată poate analiza amestecuri metanol+etanol în următoarele domenii de
36 concentrație: 3...70 mmol/L pentru metanol și, respectiv, 15...110 mmol/L etanol.

37 Metoda enzimatică de analiză raportată în *European Food Research and Technology*,
38 226, 1335-1342, 2008, este suficient de sensibilă pentru a determina metanolul și etanolul
39 la niveluri de concentrație întâlnite în mod normal în băuturile alcoolice, nefiind nevoie de pre-
40 concentrarea analiților, ci eventual de simpla diluare a probelor în cazul în care concentrațiile
41 sunt prea mari. Problema care trebuie rezolvată în cazul identificării băuturilor alcoolice
42 falsificate cu metanol, utilizând metoda enzimatică de analiză, constă în mărirea selectivității
43 de măsurare a metanolului în prezența etanolului, pentru a se lărgi gama de concentrații de
44 metanol pentru care poate fi furnizată o alarmă privind prezența metanolului în băutura
45 alcoolică respectivă.

46 Metoda conform invenției, pentru determinarea concentrațiilor de metanol și etanol,
47 în special din băuturi alcoolice falsificate, prin analize amperometrice, cu ajutorul unui sistem
format din doi biosenzori, dintre care unul este un biosenzor bazat pe alcool dehidrogenază

(ADH), modificat cu Meldola blue, iar cel de-al doilea este un biosenzor bazat pe alcool oxidază (AOX), modificat cu Co-ftalocianină, constă în următoarele etape:	1
- se măsoară semnalul analitic atât pentru biosenzorul pe bază de ADH, cât și pentru biosenzorul pe bază de AOX, unde AOX este extrasă din <i>Hansenula polymorpha</i> , în soluții agitate magnetic, ce cuprind tampon, ca diferență între intensitatea curentului, măsurată după injectarea unei probe care cuprinde amestec de etanol și metanol, și intensitatea curentului, măsurată înainte de injectarea probei;	3
- se determină concentrația de etanol din probă, prin interpolarea semnalului analitic măsurat pentru biosenzorul bazat pe ADH într-o curbă de calibrare prestabilită;	5
- se determină concentrația de metanol prin interpolarea semnalului analitic măsurat pentru biosenzorul pe bază de AOX, din <i>Hansenula polymorpha</i> , într-o curbă de calibrare prestabilită, care depinde atât de concentrația de metanol, cât și de cea de etanol, în care concentrația de etanol a fost în prealabil determinată cu biosenzorul bazat de ADH.	7
Metoda de analiză, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:	9
- mărește selectivitatea analizei metanolului în prezența etanolului;	11
- îmbunătățește sensibilitatea determinărilor;	13
- are erori de măsură (deviație relativă standard) reduse;	15
- este simplu de utilizat chiar și de personal mediu calificat;	17
- are un preț de cost scăzut;	19
- este portabilă;	21
- permite identificarea rapidă a băuturilor alcoolice falsificate care conțin metanol;	23
- nu necesită utilizarea unor reactivi toxici.	25
Invenția va fi prezentată în continuare în legătură cu fig. 1...3 și tabelul, ce reprezintă:	27
- fig. 1: reacțiile, mecanismele și ecuațiile cineticii producerii H_2O_2 în urma oxidării catalizate enzimatic simultan a metanolului și etanolului;	29
- fig. 2: schema aparatului;	31
- fig. 3: curba de calibrare a aparatului, intensitate - concentrația standardelor de metanol în soluție;	33
- tabelul: valorile K_M pentru metanol și etanol, raportate pentru AOX extrasă din diferite organisme. În legendă sunt prezentate concentrațiile de etanol pentru care sunt trasate curbele.	35
Metoda ameliorată, conform invenției, pentru determinarea concentrațiilor de metanol și etanol în special din băuturi alcoolice falsificate, prin analize amperometrice în soluții agitate, utilizează doi biosenzori: 1) un biosenzor bazat pe alcool dehidrogenază (ADH), care oxidează etanolul la aldehydă acetică și reduce NAD^+ la NADH, mediatorul folosit pentru modificarea electrodului indicator fiind Meldola blue, și, respectiv, 2) un al doilea biosenzor bazat pe alcool oxidaza (AOX) extrasă din <i>Hansenula polymorpha</i> , care oxidează metanolul la aldehydă formică și etanolul la aldehydă acetică, în ambele reacții catalizate enzimatic se transformă O_2 în H_2O_2 , mediatorul folosit pentru modificarea electrodului indicator fiind Co-ftalocianină. Principiul detecției metanolului și etanolului fără separarea analiților este același ca în metoda publicată în <i>European Food Research and Technology</i> , 226, 1335-1342, 2008, dar metoda de analiză conform invenției utilizează AOX extrasă din <i>Hansenula polymorpha</i> cu afinitate sporită pentru metanol și soluții agitate magnetic, ce permit coborârea limitelor de detecție și ameliorarea erorilor măsurărilor. Biosenzorul bazat pe ADH permite stabilirea concentrației de etanol din probă (nu este influențat de prezența metanolului). Răspunsul biosenzorului bazat pe AOX este dat în principal de metanol, dar este influențat și de etanol. Determinarea concentrației de metanol din probă este realizată pe baza răspunsului AOX, în care concentrația de etanol este cunoscută datorită analizei efectuate cu biosenzorul bazat pe ADH.	37

1 Selectivitatea analizelor metanolului pentru metoda enzimatică de analiză este dată
de caracteristicile AOX și, în special, selectivitatea acestora pentru metanol în prezența
3 etanolului.

5 Selectivitatea determinării metanolului în prezența etanolului a fost ameliorată prin
utilizarea în construcția biosenzorului a unei AOX extrasă dintr-un alt organism, având la
bază cinetica Michaelis-Menten pentru o enzimă care catalizează simultan conversia a două
7 substraturi în competiție pentru situsul activ al enzimei. Pentru biosenzorii bazați pe AOX,
semnalul analitic este dat de cuantificarea vitezei de producere a H_2O_2 de către AOX, prin
9 oxidarea catalitică simultană a ambilor alcooli. În fig. 1 sunt prezentate reacțiile, mecanismele
și ecuațiile care descriu cinetica ce este catalizată enzimatic pentru viteza totală de obținere
11 a unui produs de reacție comun (H_2O_2), în urma catalizării oxidării simultane a două
substraturi. Conform acestor ecuații, semnalul analitic obținut pentru fiecare amestec
13 metanol+etanol este mai mare decât semnalele analitice obținute pentru fiecare analit
separat, la aceeași concentrație și în același timp, mai mic decât suma curenților individuali.
15 Aceste rezultate certifică faptul că din semnalele analitice obținute pentru amestecuri este
posibil să cuantificăm ambii analiți. În ecuațiile 1...6, indicele ¹ reprezintă metanol și ² etanol.
17 Teoretic, viteza de producere a H_2O_2 de către AOX dizolvată în soluție, în urma oxidării
simultane a metanolului și etanolului în prezență de O_2 (reacțiile R1 și R2, cu mecanismele
19 1 și, respectiv, 2), este calculată în aceeași manieră ca și cinetica Michaelis-Menten pentru
un singur substrat. În acest caz sunt două complexe enzimă-substrat care se formează
21 (ecuația 3) și, în consecință, condiția de stare staționară este calculată prin luarea în consi-
derare a acestor două complexe enzimă-substrat (ecuația 4). Viteza totală de producere a
23 H_2O_2 este dată în ecuația 5 și este egală cu suma vitezelor de producere a formaldehidei
(ecuația 6) și a acetaldehidei (ecuația 7). Ameliorarea adusă de acest brevet constă în
25 maximizarea raportului vitezei reacției de producere a formaldehidei, în raport cu producerea
acetaldehidei prin oxidarea preferențială a metanolului în prezența etanolului, acest deziderat
27 fiind obținut pentru enzima ce are un raport maxim K_M^2/K_M^1 . Este demn de observat că, în
cazul în care concentrația unuia dintre substraturi (metanol sau etanol) este 0, ecuațiile 5,
29 6 și 7 devin ecuația clasică Michaelis-Menten (9: exemplul dat pentru $S^2 = 0$, dar aceeași
observație este valabilă și pentru $S^1 = 0$).

31 La analiza cu biosenzorul bazat pe AOX a unor amestecuri metanol-etanol, pentru
a avea un răspuns cât mai selectiv pentru metanol în prezența etanolului, este esențial ca
33 enzima să aibă o selectivitate cât mai mare pentru metanol, relativă la selectivitatea pentru
etanol. Selectivitatea AOX pentru metanol în prezența etanolului este dată de diferența între
35 afinitățile pentru cele două substraturi. Afinitatea unei enzime pentru substrat este caracte-
rizată de constanta Michaelis (K_M), care este exprimată în valori de concentrație. Cu cât este
37 mai mare valoarea acestei constante, cu atât va fi mai mică afinitatea enzimei pentru
substratul respectiv. Din ecuațiile teoretice prezentate în fig. 1, se observă că o mai bună
39 selectivitate în determinarea metanolului în prezența etanolului este dată de raportul
constantelor K_M ale AOX determinate pentru etanol și metanol. Este cunoscut faptul că
41 enzimele provenite din diferite organisme prezintă K_M diferite. Astfel, este posibil să se
aleagă o sursă pentru AOX care să permită ca semnalul analitic obținut să fie cât mai se-
43 lectiv pentru metanol. Din K_M prezentate în tabel se observă că AOX provenită din *Hansenula*
polymorpha permite o ameliorare a selectivității. Astfel, raportul constantelor K_M pentru AOX
45 provenită din *Hansenula polymorpha* este de 7,53, semnificativ mai mare în comparație cu
2,0, cât este raportul pentru AOX provenită din *Pichia pastoris*, enzima care este utilizată în
47 metoda publicată în *European Food Research and Technology*, 226, 1335-1342, 2008.

Proba de analizat (băutură alcoolică potențial falsificată) este analizată direct cu cei doi biosenzori bazați pe ADH (pentru determinarea concentrației de etanol) și, respectiv, AOX (pentru cuantificarea semnalului furnizat de amestecul metanol+etanol). În cazul în care proba este prea concentrată (semnal mai mare decât curba de calibrare), aceasta va fi diluată în tampon și reanalizată. Biosenzorii sunt cuplați la un potențostat și este măsurată intensitatea curentului la potențial constant (semnal analitic), care este corelată cu concentrația de analit din probă.

Aparatul pentru realizarea metodei conform invenției cuprinde un ansamblu format dintr-un potențostat controlat de calculator, un agitator magnetic pentru asigurarea transportului prin convecție a analiților către suprafața biosenzorilor, doi biosenzori enzimatici, bazați pe ADH și, respectiv, AOX, utilizați succesiv. Inițial proba este analizată cu biosenzorii bazați pe ADH, pentru a se stabili concentrația de etanol, și apoi este analizată cu biosenzorii bazați pe AOX, pentru a se măsura răspunsul produs de metanol+etanol. Cunoscându-se concentrația de etanol, se poate afla, cu ajutorul biosenzorilor bazați pe AOX, concentrația de metanol din probă.

Construcția biosenzorilor a fost realizată prin imobilizarea enzimei (AOX, respectiv, ADH), prin includere în matrice fotopolimerizabilă pe electrozi screen printați care conțin un mediator. Pentru cuantificarea H_2O_2 rezultată din reacțiile catalizate de AOX au fost folosiți electrozi indicatori modificați cu Co-ftalocianină. Pentru cuantificarea NADH rezultat din reacția catalizată de ADH au fost utilizați electrozi indicatori modificați cu Meldola blue. În afara electrodului indicator pe care au fost imobilizate enzimele, electrozii screen printați mai conțin un electrod de referință Ag/AgCl și, respectiv, un electrod auxiliar.

2,6 mg de AOX (extrasă din *Hansenula polymorpha*, conform invenției) a fost imobilizată, 10 UI/mg au fost diluați cu 40 μ L apă distilată, peste care s-au adăugat 40 μ L de mer PVA-SbQ. Apoi, amestecul enzimă cu PVA-SbQ a fost omogenizat prin amestecare cu un vortex, după care 2 μ L din această soluție au fost depuși și întinși pe suprafața electrodului indicator. Electrozii au fost expuși la lumină de neon timp de 4 h, la +4°C, pentru a avea loc includerea enzimei prin fotopolimerizarea merilor. Electrozii au fost după aceea stocați maximum o lună la -20 °C, în pungi de plastic închise, pentru a fi protejați de umiditate. Enzima ADH a fost imobilizată identic cu metoda raportată în *European Food Research and Technology*, 226, 1335-1342, 2008, și anume: 3 mg de ADH au fost solubilizate în 50 μ L apă distilată și amestecate cu 40 μ L PVA-SbQ. Pe suprafața electrozilor indicatori care au un mediator specific NADH au fost depuși câte 2 μ L și polimerizați în mod identic cu biosenzorii bazați pe AOX. Prezenta invenție se referă la ameliorarea performanțelor analitice ale sistemului bienzimatic prin utilizarea de AOX extrasă din *Hansenula polymorpha*, biosenzorii bazați pe ADH fiind identici cu cei publicați în articolul menționat.

Analizele amperometrice realizate cu biosenzorii bazați pe ADH sau AOX au fost realizate în soluții agitate magnetic, utilizând un agitator 1 și o bară magnetică acoperită cu teflon 2. Măsurătorile electrochimice au fost realizate într-o celulă electrochimică 3, în soluție de tampon 0,1 mol/L tampon fosfat pH = 8,0, care conține și 0,1 mol/L KCl. Volumul de tampon utilizat este de 5 mL pentru biosenzorii bazați pe AOX și, respectiv, 4,75 mL pentru biosenzorii bazați pe ADH. Măsurătorile au fost efectuate cu un potențostat 8 dotat cu un filtru pentru reducerea zgomotului electromagnetic creat de câmpul magnetic variabil al agitatorului. Potențostatul este controlat de un calculator 9, ce realizează și înregistrarea și prelucrarea semnalelor. La electrodul indicator 4 pe suprafața căruia a fost imobilizată AOX a fost aplicat un potențial constant +600 mV, măsurat față de electrodul screen printat Ag/AgCl de pseudoreferință 5. Pentru biosenzorii bazați pe ADH a fost aplicat un potențial

de -10 mV și adăugat în celula electrochimică 250 μ L de soluție 80 mmol/L NAD^+ . Conexiunea între electrozii 4 și 5 și potențostat a fost realizată cu ajutorul unui cablu ecranat 7. După stabilizarea curentului (măsurarea liniei de bază), 50 μ L de probă au fost injectați cu o pipetă mecanică 6 și a fost înregistrată variația intensității curentului până la stabilizarea pe un platou. Semnalul analitic constă în diferența între intensitatea curentului între linia de bază și platou. Timpul necesar pentru stabilizarea liniei de bază a fost de 2...3 min și, pentru obținerea platoului, de aproximativ 1...2 min. Electrozii și celula electrochimică au fost spălați cu apă distilată între măsurători.

Domeniul liniar al biosenzorilor bazați pe ADH este 0,001...0,09 mmol/L etanol ($n = 5$; $I(\text{nA}) = 1650 \times \text{ConcEtanol (mmol/L)} + 17.021$; $R^2 = 0,9913$). Biosenzorii bazați pe ADH prezentați în *European Food Research and Technology*, 226, 1335-1342, 2008, aveau un domeniu liniar al răspunsului, cuprins între 0,3 și 8 mmol/L. Diferența între aceste domenii de concentrație este explicată prin modificarea metodei de analiză: cronoamperometrie în picătură pentru metoda raportată în literatură (puțin sensibilă) și, respectiv, amperometrie în soluție agitată magnetic (cu sensibilitate sporită), pentru metoda optimizată din prezentul brevet. Diferența de sensibilitate este dată de agitarea magnetică a soluțiilor care modifică modalitatea de transport a analiților la suprafața biosenzorilor unde sunt analizați. Dacă în picătură analiții sunt transportați din masa soluției către electrod prin difuzie-transport lent și ineficient, prin agitarea soluției se asigură un transport rapid al analiților către suprafața electrozilor, ceea ce asigură o concentrație locală de analit crescută și, în consecință, o sensibilitate mărită a determinărilor. Un dezavantaj care apare în cazul agitării magnetice a soluțiilor este inducerea unui curent alternativ parazit în bucla formată de electrozi-soluție-conector, din cauza câmpului magnetic variabil indus de agitator. Pentru îndepărtarea acestui zgomot electromagnetic este necesar ca potențostatul utilizat să conțină un filtru tip low-pass, pentru separarea curentului continuu (faradaic-semnal analitic) de cel alternativ datorat inducției. Acest filtru permite ameliorarea limitei de detecție prin reducerea zgomotului de fond. Cum a fost demonstrat și în articolul publicat în *European Food Research and Technology*, 226, 1335-1342, 2008, răspunsul biosenzorilor la etanol nu este afectat de prezența metanolului în soluție. Astfel, prin interpolarea intensității măsurate la analiza unei probe reale care conține etanol+metanol, se obține concentrația de etanol din proba de analizat.

Biosenzorii bazați pe AOX din *Hansenula polymorpha* sunt capabili să analizeze soluții de amestec metanol+etanol care conțin alcoolii în următorul domeniu de concentrații: 0,005...0,2 mmol/L metanol și, respectiv, 0,03...0,3 mmol/L etanol. Aceste domenii de concentrație sunt mult reduse în comparație cu cele raportate în *European Food Research and Technology*, 226, 1335-1342, 2008 (3...70 mmol/L pentru metanol și, respectiv, 15...110 mmol/L etanol), întrucât se folosesc soluții agitate magnetic.

Pentru interpolarea matematică a rezultatelor experimentale obținute pentru metanol și etanol au fost utilizate 30 de puncte experimentale $I(\text{nA}) = f(\text{Concentrație metanol, Concentrație etanol})$: 6 de la graficul de calibrare realizat pentru metanol (în absența etanolului), 5 de la graficul de calibrare realizat pentru etanol (în absența metanolului), 18 pentru soluții standard cu amestecuri metanol-etanol și forțarea trecerii graficului prin origine. Interpolarea rezultatelor experimentale a fost făcută conform ecuației (5), folosind un soft disponibil comercial: GOSA-fit v3.b2 (© Bio Log). Parametrii de interpolare regăsiți au fost notați cu apm deoarece sunt determinați pentru AOX din *Hansenula polymorpha* imobilizată, și nu liberă în soluție (ap - aparent), și corectate pentru amestec substraturi (m - mixt). Parametrii ecuației interpolate regăsiți au fost: $K_M^{apm}{}_{\text{metanol}} = 0,2 \pm 0,1$ mmol/L, $I_{\text{max}}^{apm}{}_{\text{metanol}} = 369 \pm 105$ nA și, respectiv, $K_M^{apm}{}_{\text{metanol}} = 0,3 \pm 0,14$ mmol/L, $I_{\text{max}}^{apm}{}_{\text{metanol}} = 298 \pm 106$ nA, cu un coeficient de corelație de $R^2 = 0,949$. De notat că în cazul enzimei imobilizate parametrul V_{max} este înlocuit cu I_{max}^{apm} pentru ambii analiți.

RO 125232 B1

În fig. 3 este prezentat graficul de calibrare obținut pentru biosenzorii cu AOX pentru ambii analiți prezenți simultan în soluție. Curba de calibrare este ca o reprezentare 2D, obținută folosind softul GOSA-fit pentru o înțelegere mai ușoară a interpolărilor făcute pentru ambii analiți, și o mai bună reprezentare a diferențelor între valorile teoretice obținute (curbele) și punctele experimentale. Pentru interpolarea rezultatelor experimentale se folosesc curbele de calibrare din fig. 3, iar concentrația de etanol este deja determinată folosind biosenzorii bazați pe ADH.

Limita de detecție a biosenzorilor cu AOX din *Hansenula polymorpha* pentru un alcool în absența celuilalt este de 0,005 mmol/L metanol, pentru care este înregistrat un semnal de 8 nA, și, respectiv, 0,03 mmol/L etanol, pentru care este înregistrat un semnal de 15 nA. În cazul în care în proba de analizat sunt prezenți ambii alcooli simultan, limita de detecție pentru fiecare alcool depinde de concentrația celuilalt și este cu atât mai slabă cu cât este mai mare concentrația celuilalt alcool.

Deviația relativă standard, calculată pentru o probă care conține 0,1 mmol/L etanol și 0,04 mmol/L metanol, a fost de 3,9% pentru $n = 11$ determinări efectuate ($I(nA) = 109 \pm 4,3$ nA). Această deviație relativă standard este mult ameliorată în comparație cu cea raportată în *European Food Research and Technology*, 226, 1335-1342, 2008 (RSD = 13,8%), unde erau utilizate măsurători în picătură, ameliorare posibilă datorită utilizării pentru măsurători de soluții agitate magnetic ce asigură un transport reproductibil și constant al analiților către suprafața biosenzorilor, unde sunt catalizați de enzimă. Totodată, agitatea magnetică asigură și îndepărtarea rapidă și reproductibilă a produșilor de reacție de la suprafața electrodului, asigurând astfel condiții catalitice constante.

Tabel

K _M (mmol/L)		Raport K _M etanol/metanol	Organism
Etanol	Metanol		
16,2	2,15	7,53	<i>Hansenula polymorpha</i>
1	0,5	2	<i>Pichia pastoris</i>
0,13	0,019	6,84	<i>Candida sp.</i>
1	0,2	5,00	<i>Poria contigua</i>
-	0,5	-	<i>Pichia sp.</i>
1,97	0,785	2,51	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
10	1,52	6,58	<i>Basidiomycete sp.</i>
2,9	1,8	1,61	<i>Peniophora gigantea</i>
8,23	2,43	3,39	<i>Candida methanosorbosa</i>
-	3	-	<i>Candida boidinii</i>

Revendicări

1. Metodă pentru determinarea concentrațiilor de metanol și etanol, în special din băuturi alcoolice falsificate, prin analize amperometrice, cu ajutorul unui sistem format din doi biosenzori, dintre care unul este un biosenzor bazat pe alcool dehidrogenază (ADH), modificat cu Meldola blue, iar cel de-al doilea este un biosenzor bazat pe alcool oxidază (AOX), modificat cu Co-ftalocianină, **caracterizată prin aceea că:**

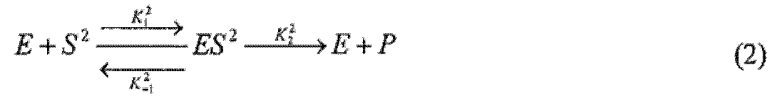
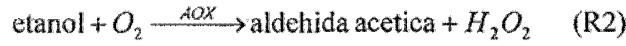
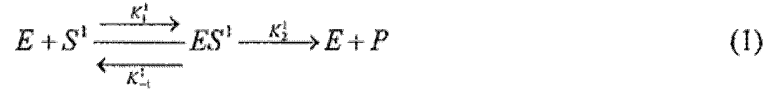
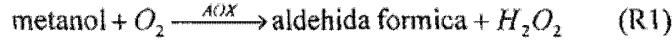
- se măsoară semnalul analitic atât pentru biosenzorul pe bază de ADH, cât și pentru biosenzorul pe bază de AOX, unde AOX este extrasă din *Hansenula polymorpha*, în soluții agitate magnetic, ce cuprind tampon, ca diferență între intensitatea curentului măsurată după injectarea unei probe care cuprinde amestec de etanol și metanol, și intensitatea curentului măsurată înainte de injectarea probei;

- se determină concentrația de etanol din probă, prin interpolarea semnalului analitic măsurat pentru biosenzorul bazat pe ADH într-o curbă de calibrare prestabilită;

- se determină concentrația de metanol prin interpolarea semnalului analitic măsurat pentru biosenzorul pe bază de AOX, din *Hansenula polymorpha*, într-o curbă de calibrare prestabilită, care depinde atât de concentrația de metanol, cât și de cea de etanol, în care concentrația de etanol a fost în prealabil determinată cu biosenzorul bazat de ADH.

2. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** biosenzorul pe bază de alcool dehidrogenază este realizat prin imobilizarea alcool dehidrogenazei pe suprafața unui electrod indicator, prin includere în matrice fotopolimerizabilă din PVA-SbQ.

3. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** biosenzorul pe bază de alcool oxidază este realizat prin imobilizarea alcool oxidazei pe suprafața unui electrod indicator, prin includere în matrice fotopolimerizabilă din PVA-SbQ.



$$[E_0] = [E] + [ES^1] + [ES^2] \quad (3)$$

$$\frac{d[ES^1]}{dt} + \frac{d[ES^2]}{dt} = k_1^1[E][S^1] - k_{-1}^1[ES^1] - k_2^1[ES^1] + k_1^2[E][S^2] - k_{-1}^2[ES^2] - k_2^2[ES^2] = 0 \quad (4)$$

$$\frac{d[H_2O_2]}{dt} = k_2^1[ES^1] + k_2^2[ES^2] = \frac{V_{\max}^1[S^1]K_M^2 + V_{\max}^2[S^2]K_M^1}{K_M^1K_M^2 + K_M^2[S^1] + K_M^1[S^2]} \quad (5)$$

$$\frac{d[\text{formaldehida}]}{dt} = k_2^1[ES^1] = \frac{V_{\max}^1[S^1]K_M^2}{K_M^1K_M^2 + K_M^2[S^1] + K_M^1[S^2]} \quad (6)$$

$$\frac{d[\text{acetaldehida}]}{dt} = k_2^2[ES^2] = \frac{V_{\max}^2[S^2]K_M^1}{K_M^1K_M^2 + K_M^2[S^1] + K_M^1[S^2]} \quad (7)$$

$$\frac{d[\text{formaldehida}]}{dt} / \frac{d[\text{acetaldehida}]}{dt} = \frac{V_{\max}^1[S^1]K_M^2}{V_{\max}^2[S^2]K_M^1} = \max \Rightarrow K_M^2 \gg K_M^1 \quad (8)$$

$$[S^2] = 0 \Rightarrow \frac{d[H_2O_2]}{dt} = \frac{V_{\max}^1[S^1]}{K_M^1 + [S^1]} \quad (9)$$

Fig. 1

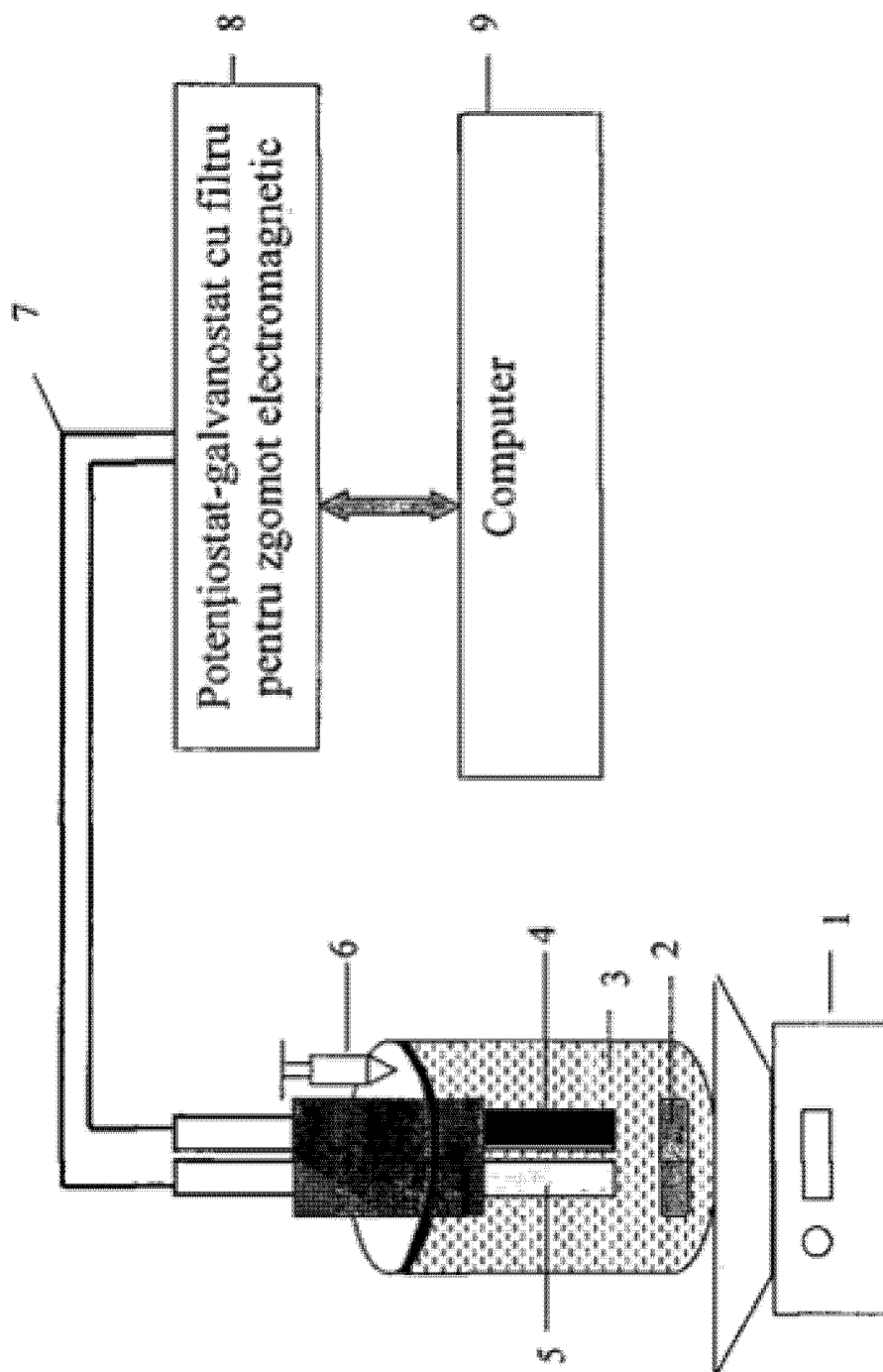


Fig. 2

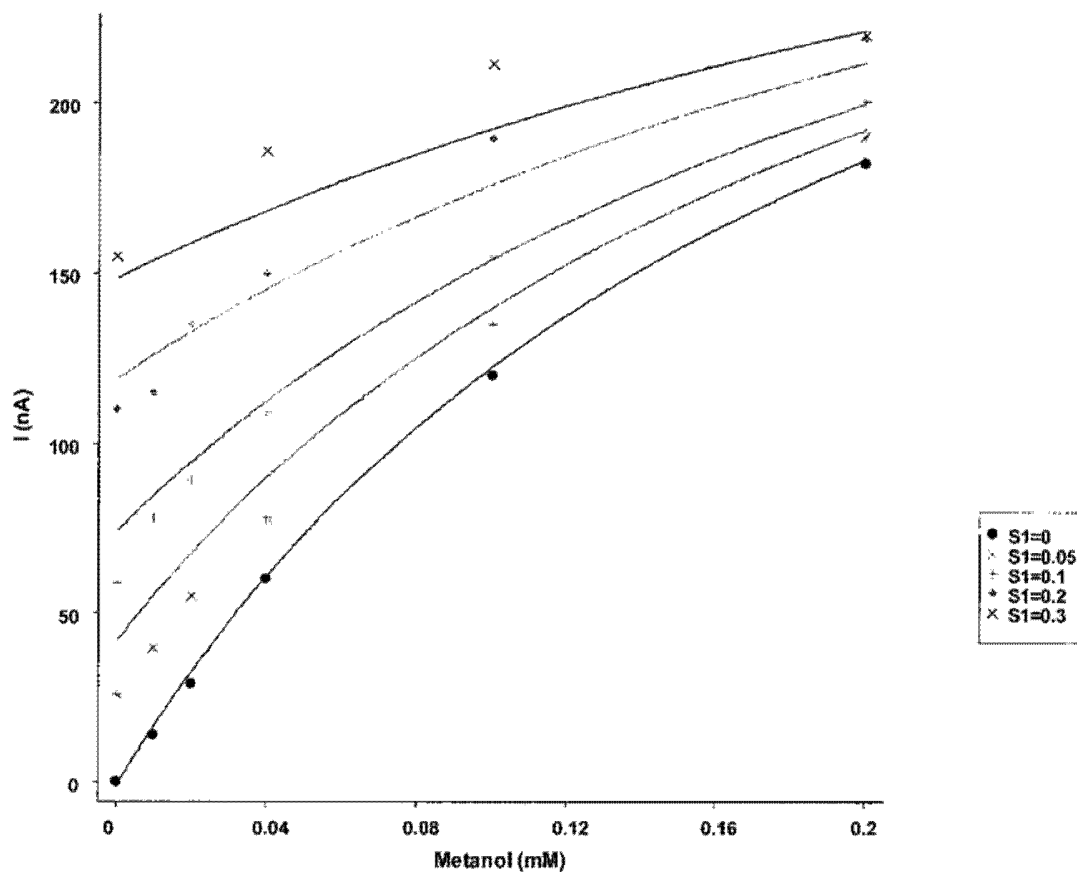


Fig. 3

