



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: 94-01987

(61) Perfectionare la brevet:
Nr.

(22) Data de depozit: 13.12.1994

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(30) Prioritate:

(86) Cerere internațională PCT:
Nr.

(41) Data publicării cererii:
BOP nr.

(87) Publicare internațională:
Nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.12.1998 BOP nr. 12/1998

(56) Documente din stadiul tehnicii:
CS 199291

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOP nr.

(71) Solicitant: S.C. BIOTEHNOS S.A.-BUCUREȘTI, BUCUREȘTI, RO;

(73) Titular: S.C. BIOTEHNOS S.A.-BUCUREȘTI, BUCUREȘTI, RO;

(72) Inventator: POPESCU ELENA MONICA, BUCUREȘTI, RO; ZGLIMBEA LENUTA, BUCUREȘTI, RO;

(74) Mandatar:

(54) **METODĂ COLORIMETRICĂ DE DETERMINARE A
CONCENTRAȚIEI DE ALCOOL ETILIC DIN MEDII DE FERMENTATIE**

(57) **Rezumat:** Prezenta invenție se referă la o metodă colorimetrică de determinare cantitativă a concentrației de alcool etilic din mediile de fermentatie, utilizabilă în industria proceselor fermentative, biotehnologie, biologie. Metoda asigură determinarea cantitativă a etanolului din medii de fermentatie și din alte lichide biologice, după îndepărtarea celorlalte componente, prin distilare, operație ce asigură recuperarea în proporție de 98...

99% a alcoolului etilic; în distilat se efectuează reacția de oxidare cu un exces de bicromat de potasiu în mediu acid, iar intensitatea colorației se determină spectrofotometric la 590 nm. Aplicarea acestei metode se realizează ușor, cu consumuri reduse de reactivi și aparamatură accesibilă.

Revendicări: 1

RO 110565 B1



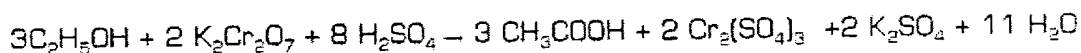
Prezenta invenție se referă la o metodă colorimetrică de determinare cantitativă a concentrației de alcool etilic din medii de fermentație și alte lichide biologice, ce se poate utiliza în industria proceselor fermentative, farmaceutică, biotehnologie, biologie.

Până în prezent, se cunosc următoarele metode de determinare cantitativă a alcoolului etilic din mediile de fermentație și alte lichide biologice:

- metoda prin determinarea densității cu picnometrul, ce admite erori mari de analiză (aproximativ 7%) ce devine inoperantă în cazul analizei efectuate în lichide biologice - medii de fermentație - din cauza erorilor mari înregistrate, metode volumetrice oxidative directe, de

determinare a concentrației alcoolului etilic, folosind atacul oxidant al $K_2Cr_2O_7$ în mediu acid; această metodă este greu de aplicat în medii de fermentație, lichide biologice, din cauza complexității compusilor prezenți, ce interferează în reacția de oxidare, presupunând erori importante și procedee cromatografice: cromatografia de lichide de înaltă performanță, cromatografia de gaze. Aceste procedee presupun achiziționarea unei aparaturi costisitoare, inaccesibilă unităților mici, cu posibilități materiale modeste.

Reacția chimică implicată în determinarea cantitativă a alcoolului etilic prin oxidare cu bicromat de potasiu și acid sulfuric este descrisă de ecuația:



Această reacție nu poate fi utilizată direct, deoarece reacțiile colaterale ce conduc la bioxid de carbon și apă [oxidarea completă], sau anhidrida acetică (oxidarea incompletă), se produc într-o proporție ce depinde de condițiile de lucru. Dacă se utilizează inițial un exces de bicromat de potasiu pentru oxidarea etanolului, acest exces poate fi determinat prin metode volumetrice (titrare cu sare Mohr, în prezența de feroină) sau spectrofotometrice (la maximum de absorbție stabilit experimental). Metodele volumetrice presupun erori importante, fie din cauza metodei însăși, fie din cauza operatorului.

Metoda conform invenției înlătură dezavantajele mai sus-menționate prin aceea că determinarea după distilarea controlată, timp de 30 ... 40 min la temperatura de 98 ... 100°C a mediului de fermentație, pentru îndepărtarea componentelor ce interferează în reacția finală de oxidare și recuperarea în proporție de 98 ... 99% a alcoolului etilic prezent în mediu, se efectuează pe volume determinate de distilat -10 ml-, în funcție de concentrația alcoolului etilic prezent în distilat, diluții corespunzătoare sensibilității metodei- 0,1 ... 0,6g % ml, având loc o reacție de oxidare cantitativă, cu

20 ml soluție de $K_2Cr_2O_7$ 33,792 g/l. în exces, în mediu de H_2SO_4 conc.p.a. cu $d_{20^\circ C} = 1,84 \text{ g/cm}^3$ urmată de omogenizarea reactanților și răcirea rapidă, intensitatea colorației obținute determinându-se spectrofotometric la 590 nm, în celule de 1 cm^3 , iar calculul concentrației de alcool etilic se efectuează cu ajutorul unei curbe etalon pentru alcool etilic absolut, p.a., ținând cont de diluțiile efectuate.

Invenția prezintă avantajul dozării cantitative a alcoolului etilic în distilat, prin reacția de oxidare cu un exces de bicromat de potasiu în mediu acid. Aplicarea ei se realizează ușor, cu consumuri reduse de reactivi și aparatură accesibilă.

Se dau, în continuare, exemple de realizare a invenției prin determinări cantitative a alcoolului etilic, în medii sintetice de fermentație-dextroza, xiloza- și în medii naturale pe bază de melasă, suc de sorg, suc de sfeclă.

Exemplul 1. Determinarea alcoolului etilic în medii sintetice de fermentație - pe bază de dextroză, xiloză. Mediul de fermentație utilizat conține dextroza (sau xiloza) în diferite concentrații, celule de drojdii, metaboliți secundari și alcool etilic- ca metabolit principal.

Pentru determinarea alcoolului etilic, este necesară o operație de distilare pentru îndepărtarea componentelor ce interferă în reacția de oxidare finală, timp de 30 min, la 98 ... 100°C, operație ce asigură recuperarea în proporție de 98 ... 99 % a alcoolului etilic prezent în mediul de fermentație.

Reactivii utilizați sunt: soluție 33,792 g/l de $K_2Cr_2O_7$, H_2SO_4 concentrat, cu $d_{20°C} = 1,84$ g/cm³.

La un volum de 100 ml din mediul de fermentație conținând zaharuri simple neconsumate, etanol, celule de drojdie, proteine, exometaboliți, săruri minerale, se efectuează operația de distilare timp de 30 min, la 98 ... 100°C.

Pe un volum de 10 ml distilat, exact măsurat, (la concentrații mari de alcool etilic, se efectuează diluții corespunzătoare sensibilității metodei 0,1 ... 0,6 g % ml) se determină alcoolul etilic adăugând 20 ml soluție 33,792 g/l $K_2Cr_2O_7$, în exces, și 10 ml H_2SO_4 concentrat p.a. $d_{20°C} = 1,84$ g/cm³, după omogenizare și răcire rapidă - 15 min - se efectuează determinarea spectrofotometrică la 590 nm, în celule de 1 cm³, față de un martor preparat în același mod ca și proba din mediul de fermentație, dar înlocuind distilatul (sau diluția acestuia) cu apă distilată.

Calculul concentrației de alcool etilic se efectuează cu ajutorul unei curbe etalon realizată cu alcool etilic absolut, p.a., ținând cont de diluțiile efectuate în distilat.

Exemplul 2. Determinarea alcoolului etilic în medii de fermentație pe bază de melasă, suc de sorg, suc de sfeclă. Mediile naturale de fermentație conțin zaharuri (mono și oligozaharide) neconsumate, metaboliți de fermentație, proteine, celule de drojdie, săruri minerale, ce nu permit determinarea directă a alcoolului etilic.

În vederea obținerii unui volum din

mediul de fermentație, pe bază de melasă, accesibil determinării alcoolului etilic, 100 ml din acesta se supune unei operații de distilare înaintată, la 98 ... 100°C, timp de 30 min (realizându-se în acest mod recuperarea în proporție de 98 ... 99% a alcoolului etilic și îndepărtarea componentelor ce interferă în reacția de dozare). Din distilatul obținut, - 50 ml - se prelevează volume exact măsurate - 10 ml; în funcție de concentrația alcoolului etilic prezent în distilat, se efectuează diluții corespunzătoare sensibilității metodei (0,1 ... 0,6 g%/ml) - 1/20 în exemplul de față. Într-un volum de 10 ml de distilat - sau diluția acestuia - exact măsurat se determină alcoolul etilic, adăugând un volum de 20 ml de soluție 33,792 g/l de $K_2Cr_2O_7$, în exces și 10 ml H_2SO_4 conc.p.a. $d_{20°C} = 1,84$ g/cm³ după omogenizarea și răcirea rapidă a probei (15 min) se efectuează determinarea spectrofotometrică, la lungimea de undă de 590 nm, în celule de 1 cm³, față de un martor pregătit în același mod ca și proba din mediul de fermentație, dar înlocuind distilatul cu apă distilată.

Extincția (E) înregistrată la 3 probe paralele, a fost 0,50.

Calculul concentrației de alcool etilic se efectuează cu ajutorul unei curbe etalon realizată cu alcool etilic absolut p.a., ținând cont de diluțiile efectuate.

Stabilirea curbei etalon. Curba etalon s-a realizat pe o soluție de alcool etilic absolut 5 g% ml. S-au realizat diluții a căror concentrație în alcool etilic a fost cuprinsă între 0,1 și 0,5 g% ml și care au fost prelucrate conform modului de lucru descris (reacția de oxidare cu bicromat de potasiu în mediu acid).

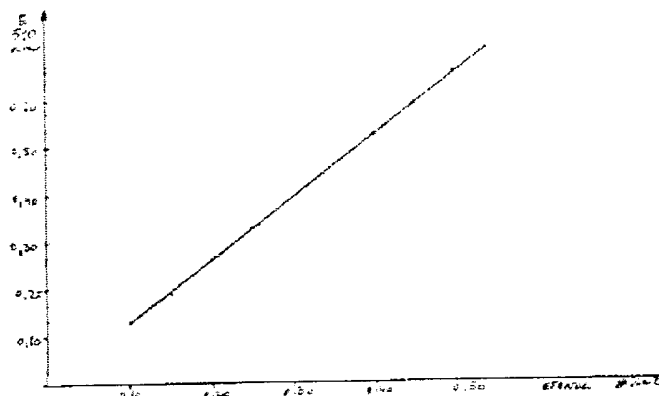
Valorile medii obținute din 10 curbe etalon paralele sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Etanol g%ml	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50
	0,13	0,19	0,26	0,33	0,38	0,46	0,52	0,59	0,66

Prelucrarea rezultatelor: pentru proba luată în lucru, extincția (**E**) înregistrată pe 3 probe paralele a fost 0,50; din curba etalon, și ținând cont de di-

luțiile efectuate (1/20 în distilat se determină concentrația de alcool etilic în valoarea de 4,25 g%ml.



Revendicare

Metodă colorimetrică de de- 30
terminare cantitativă a concentrației de
alcool etilic în medii de fermentație,
caracterizată prin aceea că, după dis-
tilarea controlată timp de 30 ... 40 min,
la temperatura de 98 ... 100°C, a 35
mediului de fermentație pentru înde-
părtarea componentelor ce interferă în
reacția finală de oxidare și recuperarea
în proporție de 98 ... 99% din alcool
etilic prezent în mediu, se efectuează pe 40
volume determinate de distilat de 10 ml,
în funcție de concentrația alcoolului etilic

prezent în distilat diluții corespunzătoare
sensibilității metodei de 0,1 ... 0,6 g la
100 ml, având loc o reacție de oxidare
cantitativă, cu 20 ml soluție 33,792
g/l de $K_2Cr_2O_7$ în exces, în mediu de
 H_2SO_4 concentrat cu $d_{20^\circ C} = 1,84 \text{ g/cm}^3$,
urmată de omogenizarea reactanților și
răcirea rapidă, intensitatea colorației
obținute determinându-se spectrofoto-
metric la 590 nm, în celule de 1 cm^3 ,
iar calculul concentrației de alcool etilic
se efectuează cu ajutorul unei curbe
etalon pentru alcool etilic absolut, p.a.
ținând cont de diluțiile efectuate.

Președintele comisiei de examinare: **ing. Barbu Mara**
Examinator: **ing. Bondar Elena**



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci