



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

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

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

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE, S**
PLAIUL INDEPENDENȚEI, NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **BUCUR BOGDAN, STR. BIBESCU VODĂ,**
BL. P2C, SC. 5, AP. 6, COD 110222,
PITEȘTI, AG, RO;

• **BUCUR MĂDĂLINA PETRUȚA,**
STR. CPT. ION BECLEANU, NR. 16,
BL. C7, SC. A, AP. 8, COD 115100,
CÂMPULUNG, AG, RO;
• **RADU GABRIEL LUCIAN,**
ALEEA ROTUNDĂ, NR. 4, BL. H6, SC. D,
AP. 61, SECTOR 3, COD 032705,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **RĂDULESCU CRISTINA, BD CEAHLĂUL,**
NR. 15, BL. 75, SC. 1, AP. 4, SECTOR 6,
COD 060373, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **AMELIORAREA PERFORMANȚELOR ANALIZIEI SIMULTANE
A METANOLULUI ȘI ETANOLULUI DIN AMESTECURI FĂRĂ
SEPARAREA ANALIȚILOR PRIN UTILIZAREA UNUI
BIOSENZOR CU AOX EXTRASĂ DIN *HANSENULA*
*POLYMORPHA***

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o metodă ameliorată, pentru determinarea concentrațiilor de metanol și etanol, prin utilizarea unui biosenzor cu AOX extrasă din *Hansenula polymorpha*, utilizată în special pentru identificarea băuturilor alcoolice falsificate. Metoda conform invenției se bazează pe analize amperometrice ale soluțiilor agitate magnetic, asigurând un transport rapid și reproductibil al analiților la suprafața bio-

senzorului cu alcool oxidază (AOX) extrasă din *Hansenula polymorpha*, care are afinitate relativă maximă pentru metanol comparativ cu etanol, caracterizată prin raportul constantelor Michaelis K_m .

Revendicări: 4
Figuri: 2



**AMELIORAREA PERFORMANȚELOR ANALIZEI SIMULTANE A
METANOLULUI ȘI ETANOLULUI DIN AMESTECURI FĂRĂ SEPARAREA
ANALIȚILOR PRIN UTILIZAREA UNUI BIOSENZOR CU AOX EXTRASĂ DIN
*HANSENULA POLYMORPHA***

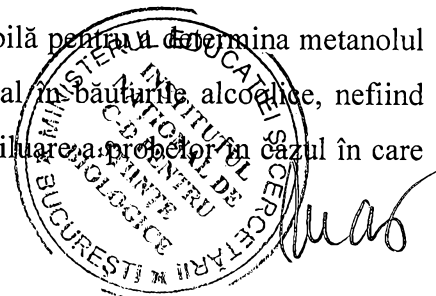
Invenția se referă la o metodă ameliorată pentru determinarea concentrațiilor de metanol și etanol, fiind utilizată, în special, la identificarea băuturilor alcoolice falsificate produse cu metanol sau amestec metanol+etanol în loc de etanol prin determinarea metanolului și etanolului, în domeniul de concentrații al amestecurilor: 0,01-0,4 mM metanol și 0,02-0,6 mM etanol.

Sunt cunoscute metode pentru analiza amestecurilor de etanol și metanol utilizând separarea celor doi analiți prin cromatografie de gaze sau lichide, și apoi cuantificarea cu diferiți detectori.

Cu toate că metodele cromatografice cunoscute permit o separare a celor doi analiți și determinarea acestora cu o rezoluție și limită de detecție suficiente, aceste metode sunt complexe prin faptul că determinările trebuie efectuate utilizând aparatură scumpă și sofisticată, aparatele nu sunt portabile, sunt necesari reactivi cu puritate foarte înaltă și personalul trebuie să fie bine calificat.

Recent a fost raportată în literatură o metodă simplă, ieftină, rapidă, portabilă pentru determinarea concentrațiilor de metanol și etanol din amestecuri bazate pe analize enzimatică, European Food Research and Technology, 226, 1335-1342, 2008, bazată pe măsurători amperometrice utilizând, pentru aceeași probă, succesiv doi biosenzori enzimatici bazați fiecare pe câte o enzimă: alcool dehidrogenaza (ADH, EC 1.1.1.1.) și alcool oxidaza (AOX, EC 1.1.3.13). Principiul de detecție este bazat pe faptul că un biosenzor bazat pe ADH va permite analiza doar a etanolului dintr-un amestec metanol+etanol, pe când răspunsul biosenzorilor bazați pe AOX este produs în special de către metanol, dar și etanol. Această metodă de analiză nu necesită etape îndelungate și complicate de separare a analiților și permit realizarea unor dispozitive portabile, dar selectivitatea măsurării metanolului și etanolului în amestecuri nu este la fel de bună ca în cazul metodelor cromatografice. Metoda enzimatică raportată poate analiza amestecuri metanol+etanol în următoarele domenii de concentrație: 3-70 mmol/L pentru metanol și respectiv 15-110 mmol/L etanol.

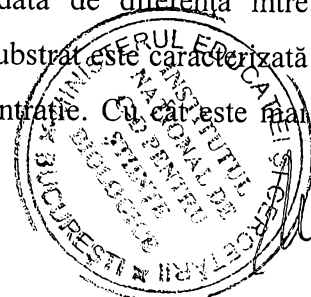
Metoda enzimatică de analiză este suficient de sensibilă pentru a determina metanolul și etanolul la nivele de concentrație întâlnite în mod normal în băuturile alcoolice, nefiind nevoie de preconcentrarea analiților ci eventual de simpla diluare a probelor în cazul în care



concentrațiile sunt prea mari. Problema care trebuie rezolvată în cazul identificării băuturilor alcoolice falsificate cu metanol utilizând metoda enzimatică de analiză constă în mărirea selectivității de măsurare a metanolului în prezența etanolului pentru a se lărgi gama de concentrații de metanol pentru care poate fi furnizată o alarmă privind prezența metanolului în băutura alcoolică respectivă.

Selectivitatea analizelor metanolului pentru metoda enzimatică de analiză este dată de caracteristicile AOX și în special selectivitatea acestora pentru metanol în prezența etanolului. 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 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 oxidarea catalitică simultană a ambilor alcooli. În figura 1 sunt prezentate reacțiile, mecanismele și ecuațiile care descriu cinetica catalizată enzimatic pentru viteza totală de obținere 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 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. Aceste rezultate certifică că din semnalele analitice obținute pentru amestecuri este posibil să cuantificăm ambii analiți. În ecuațiile 1-6, indicele ¹⁾ reprezintă metanol și ²⁾ etanol. Teoretic, viteza de producere a H_2O_2 de către AOX dizolvată în soluție în urma oxidării simultane a metanolului și etanolului în prezența de O_2 (reacțiile R1 și R2 cu mecanismele 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 (ecuația 3) și în consecință condiția de stare staționară este calculată prin luarea în considerare a acestor două complexe enzimă-substrat (ecuația 4). Viteza totală de producere a H_2O_2 este dată în ecuația 5. Este demn de observat că în ecuația 5, în cazul în care concentrația unuia dintre substrate este 0, ecuația 5 devine ecuația clasică Michaelis-Menten (6).

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 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 afinitățile pentru cele două substrate. Afinitatea unei enzime pentru substrat este caracterizată de constanta Michaelis (K_m) care este exprimată în valori de concentrație. Cu cât este mai



mare valoarea acestei constante cu atât va fi mai mică afinitatea enzimei pentru substratul respectiv. Din ecuațiile teoretice prezentate în figura 1, se observă că o mai bună 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 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 selectiv pentru metanol. Din K_m prezentate în tabelul 1 se observă că AOX provenită din *Hansenula polymorpha* permite o ameliorare a selectivității.

Proba de analizat (băuturi alcoolice) 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.

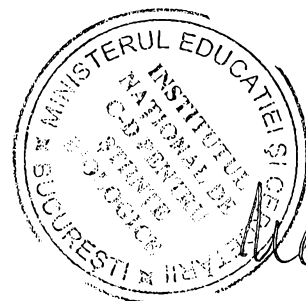
Aparatul, pentru realizarea metodei, conform invenției, cuprinde un ansamblu format dintr-un potențostat controlat de calculator, un agitator magnet pentru asigurarea transportului prin convecție a analiților către suprafața biosenzorilor, doi biosenzori enzimatici bazați pe ADH și respectiv AOX utilizați succesiv.

Metoda de analiză și biosenzorii bazați pe AOX extrasă din *Hansenula polymorpha*, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- măresc selectivitatea analizei metanolului în prezența etanolului;
- îmbunătățesc sensibilitatea determinărilor;
- au erori de măsură (deviație relativă standard) mult redusă;
- sunt simpli de utilizat chiar și de personal mediu calificat;
- au un preț de cost scăzut;
- sunt portabile;
- permit identificarea rapidă a băuturilor alcoolice falsificate care conțin metanol;
- nu necesită utilizarea unor reactivi toxici.

Invenția va fi prezentată în continuare în legătură cu figurile 1 – 3 și tabelul 1 care reprezintă:

- figura 1. Reacțiile, mecanismele și ecuațiile cineticii producerii H_2O_2 în urma oxidării catalizate enzimatic simultan a metanolului și etanolului;
- figura 2. Schema aparatului;



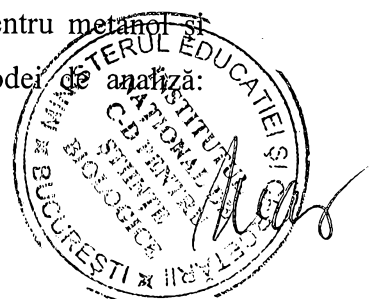
- figura 3. Curba de calibrare a aparatului, intensitate – concentrația standardelor de metanol în soluție.

-tabelul 1. Valorile Km pentru metanol și etanol raportate pentru AOX extrasă din diferite organisme. În legendă sunt prezentate concentrațiile de etanol pentru care sunt trasate curbele.

În construcția biosenzorilor enzima (AOX extrasă din *Hansenula polymorpha* conform invenției) a fost imobilizată prin includere în matrice fotopolimerizabilă pe electrozi screen printați care conțin un mediator pentru H_2O_2 (Co-ftalocianina). 2,6 mg de AOX 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 depuse și întinse pe suprafața WE. Electrozii au fost expuși la lumina de neon timp de 4 ore la +4°C pentru a avea loc includerea enzimei prin fotopolimerizarea merilor. Electrozii au fost după aceea stocați maxim o lună la -20 °C în pungi de plastic închise pentru a fi protejați de umiditate.

Analizele amperometrice au fost realizate în soluții agitate magnetic utilizând un agitator 1 și o bară magnetică acoperită cu teflon 2. În celula electrochimică 3 au fost introduse 5 mL tampon de soluție 0,1 mol/L tampon fosfat pH=8,0 care conține și 0,1 mol/L KCl. 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 care realizează și înregistrarea și prelucrarea semnalelor. La electrodul indicator 4 pe suprafața căruia a fost imobilizată enzima a fost aplicat un potențial constant +600 mV măsurat față de electrodul screen-printat Ag/AgCl de pseudoreferință 5. 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 minute și pentru obținerea platoului de aproximativ 1-2 minute. Electrozii au fost spălați cu apă distilată între măsurători.

Biosenzorii bazați pe AOX din *Hansenula polymorpha* sunt capabil să analizeze soluții de amestec metanol+etanol care conține alcooli în următorul domeniu de concentrații: 0,005-0,2 mM metanol și respectiv 0,03-0,3 mM etanol. Aceste domenii de concentrație sunt mult reduse în comparație cu cele raportate în literatura (3-70 mmol/L pentru metanol și respectiv 15-110 mmol/L etanol) și sunt explicate prin modificarea metodei de analiză:

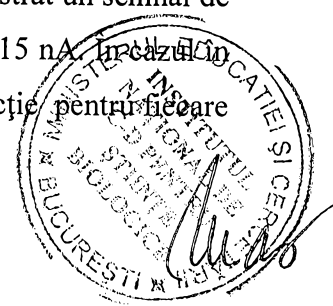


cronoamperometrie în picătură pentru metoda raportată în literatura și respectiv amperometrie în soluție agitată magnetic pentru metoda optimizată din prezentul brevet. Agitarea soluțiilor modifica modalitatea de transport a analiților la suprafața biosenzorilor unde sunt analizați. Dacă în picătură analiții sunt transportați din masa soluției către electrod prin difuzie-transport lent și inefficient, 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. În cazul agitării magnetice a soluțiilor este indus un curent alternativ parazit în bucla formată de electrozi-soluție-conector datorită câmpului magnetic variabil indus de agitator. Pentru îndepărtarea acestui zgomot electromagnetic este necesar ca potentiostatul 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.

Pentru interpolarea matematică a rezultatelor experimentale obținute pentru metanol și etanol au fost utilizate 30 de puncte experimentale $I(nA)=f(\text{Concentrație metanol, Concentrație etanol})$: 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 enzima imobilizată și nu liberă în soluție (ap – aparent) și corectate pentru amestec substrate (m -mixt). Parametrii ecuației interpolate regăsiți au fost: $K_M^{apm}_{metanol}=0,2\pm0,1$ mmol/L, $I_{max}^{apm}_{metanol}=369 \pm 105$ nA și respectiv $K_M^{apm}_{etanol}=0,3\pm0,14$ mmol/L, $I_{max}^{apm}_{etanol}=298\pm106$ 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.

În figura 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.

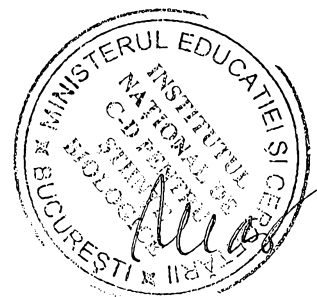
Limita de detecție a biosenzorilor cu AOX din *Hansenula polymorpha* pentru un alcool în absența celuilalt este de 0,005 mM metanol pentru care este înregistrat un semnal de 8 nA și respectiv 0,03 mM etanol pentru care este înregistrat un semnal de 15 nA. În cazul în care în proba de analizat sunt prezenți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



J

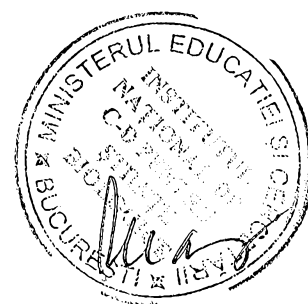
alcool depinde de concentrația celui alt și este cu atât mai slabă cu cât este mai mare concentrația celui alt alcool.

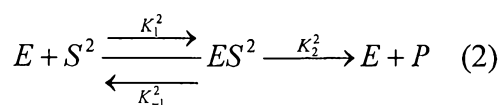
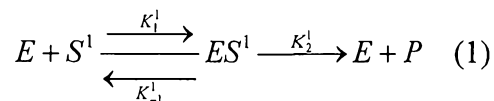
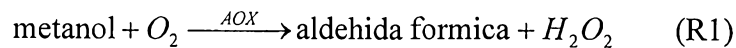
Deviația relativă standard, calculată pentru o probă care conține 0,1 mM etanol și 0,04 mM metanol a fost de 3,9% pentru $n=11$ determinări efectuate ($I(nA)=109\pm 4,3$ nA). Această deviație relativă standard este mult ameliorată în comparație cu cea raportată în literatura (RSD=13,8%) unde erau utilizate măsurători în picătură, ameliorare posibilă datorită utilizării pentru măsurători de soluții agitate magnetic care 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.



REVENDICĂRI

1. Metoda ameliorată pentru identificarea băuturilor alcoolice falsificate care conțin metanol, bazată pe analize amperometrice în soluții agitate magnetic utilizând un biosenzor cu alcool oxidaza (AOX) extrasă din *Hansenula polymorpha* care are afinitate relativă maximă pentru metanol comparativ cu etanol caracterizate prin raportul constantelor Michaelis K_m .
2. Metoda conform revendicării 1, caracterizată prin aceea că sensibilitatea biosenzorului cu AOX pentru etanol în prezența metanolului este redusă ceea ce permite ameliorarea selectivității determinării metanolului în prezența etanolului.
3. Metoda conform revendicării 1, caracterizată prin aceea că scăderea concentrațiilor de metanol și etanol analizate prin utilizarea de soluții agitate magnetic care asigură un transport rapid al analiților la suprafața biosenzorului.
4. Metoda conform revendicării 1, caracterizată prin îmbunătățirea preciziei măsurărilor (scăderea deviației relative standard pentru analiza repetată a aceleiași probe) datorită utilizării de soluții agitate magnetic care asigură un transport reproductibil al analiților la suprafața biosenzorului.





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

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

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

$$[S^2] = 0 \Rightarrow \frac{d[H_2O_2]}{dt} = \frac{V_{\max}^1[S^1]}{K_M^1 + [S^1]} \quad (6)$$

Figura 1.



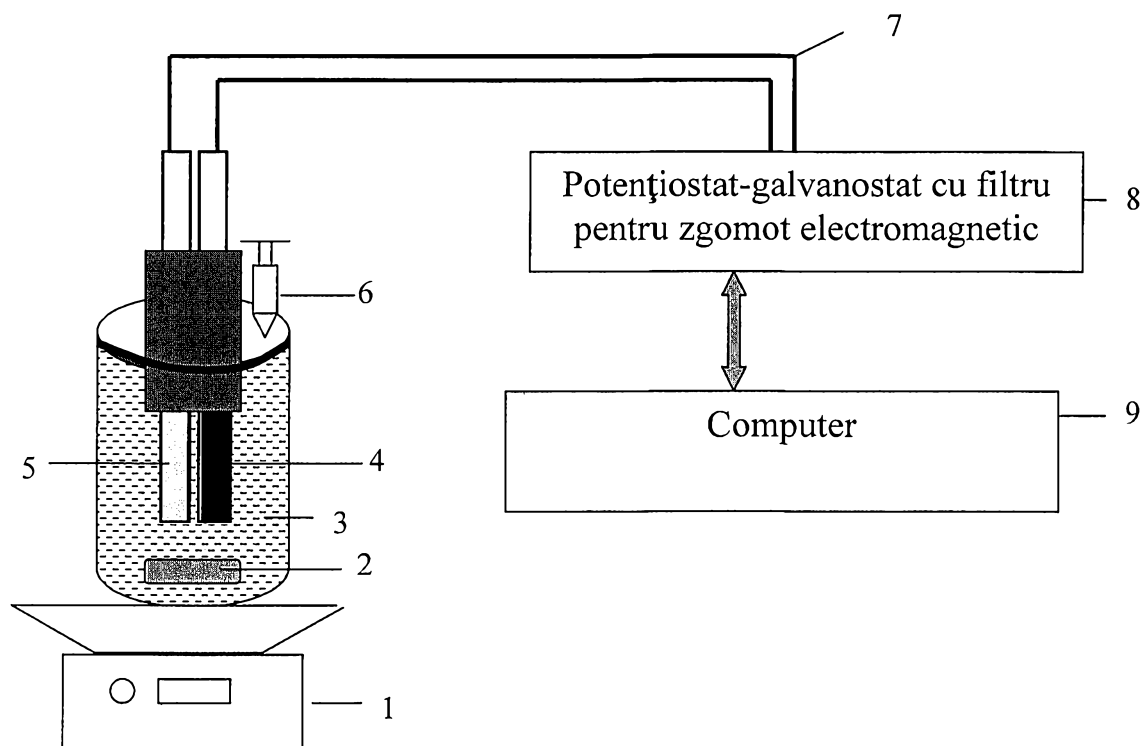


Figura 2.

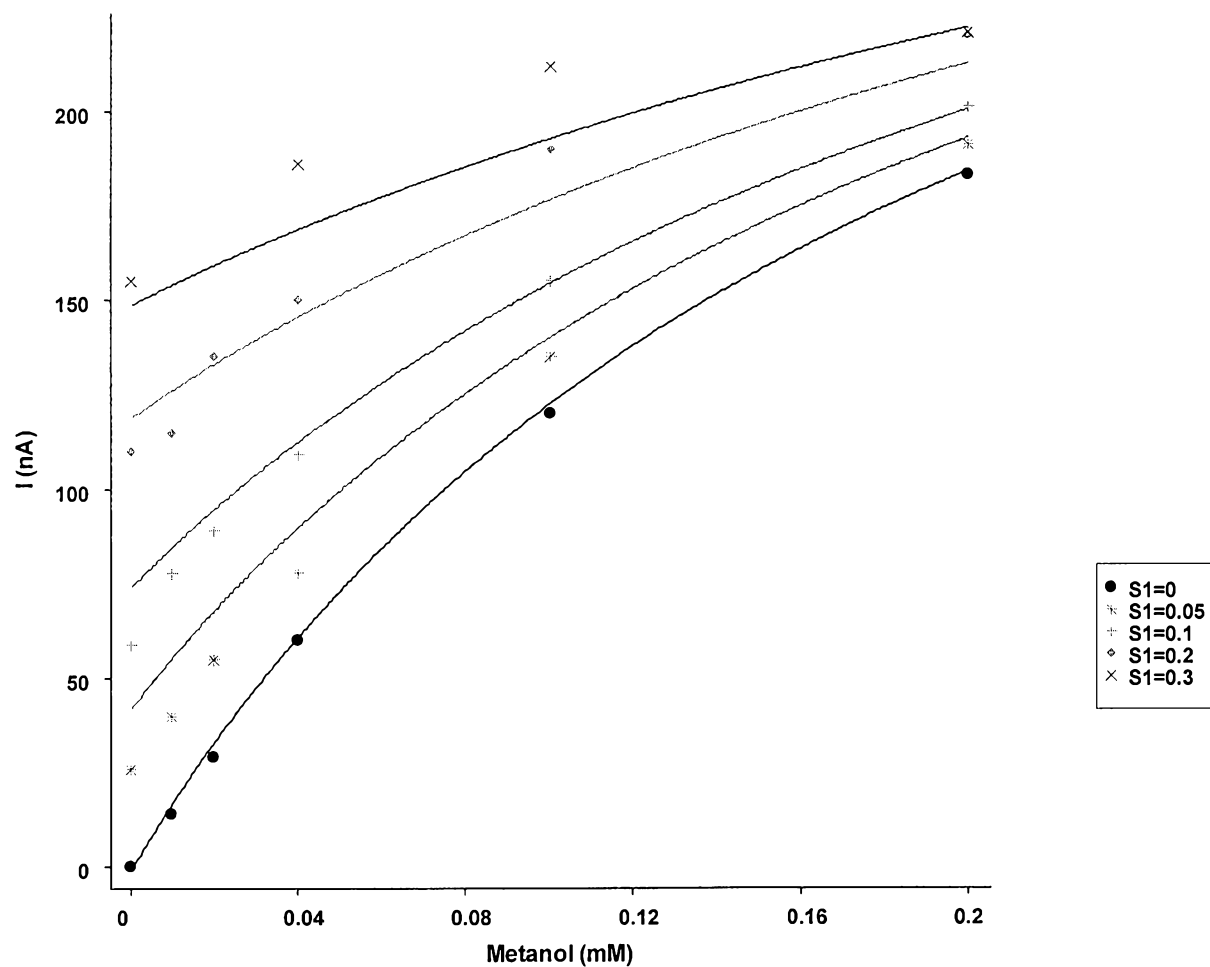


Figura 3.

Tabel 1.

K _m (mM)		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>

