



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 00357**

(22) Data de depozit: **23.04.2010**

(41) Data publicării cererii:
28.10.2011 BOPI nr. **10/2011**

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DIN ORADEA,
STR. UNIVERISTĂȚII NR.1, ORADEA, BH,
RO

(72) Inventatori:
• CĂRĂBAN ALINA MARIA,
STR. ALEXANDRU ODOBESCU NR.4,
BL.PB 69, AP.18, ORADEA, BH, RO;
• GAVRIȘ GEORGETA,
STR. STRUGURILOR NR.28, ORADEA, BH,
RO;

• BUNGĂU SIMONA, STR. N.BELDICEANU
NR.11, ORADEA, BH, RO;
• ȚARCĂ RADU CĂTĂLIN,
STR. INDEPENDENȚEI NR.51, BL. A1,
AP.1, ORADEA, BH, RO;
• ȚARCĂ IOAN CONSTANTIN,
STR. NARCISELOR NR.12/A, ORADEA, BH,
RO;
• FILIP MONICA SANDA,
STR. EPISCOP IOAN SUCIU NR.12,
BL. PC 6, ET.3, AP.8, ORADEA, BH, RO

(54) **PROCEDEU ȘI INSTALAȚIE-STAND PENTRU
DETERMINAREA ÎN TIMP REAL A VITEZEI REACȚIEI DE
HIDROLIZĂ A AMIDONULUI CU AMILAZE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu și la o instalație-stand pentru determinarea, în timp real, a vitezei reacției de hidroliză a amidonului cu amilaze. Procedeu conform invenției constă din aceea că, folosind un sistem dotat cu un interferometru Michelson, se evidențiază apariția unor franje de maximă și minimă interferență, apărute ca urmare a etapelor de hidroliză și a modificării drumului optic străbătut de un fascicul semnal al interferometrului prin proba de analizat, modificarea în timp a acestor franje de interferență fiind sesizată, achiziționată și prelucrată în timp real, ca imagine, prin prelucrarea imaginilor fiind contorizat numărul de treceri de la maxime de interferență la minime și invers, viteza de trecere de la maxime de interferență la minime evidențind în fapt viteza reacției de hidroliză. Instalația-stand folosită pentru aplicarea procedurii este alcătuită dintr-un interferometru Michelson, cu sursă laser He-Ne, în care se amplasează o cuvă conținând o probă de analizat, franjele de interferență generate de interferometru formându-se pe un ecran, de unde sunt preluate sub formă de imagini, de către un senzor de tip

CCD, imaginile fiind transmise prin intermediul unei interferțe, la o placă de achiziție a unui calculator, pentru a fi prelucrate.

Revendicări: 7
Figuri: 10

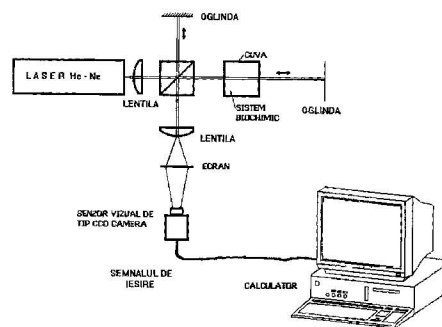
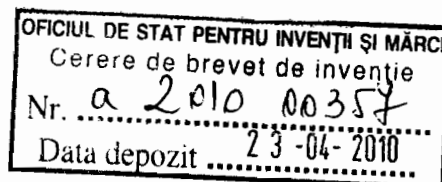


Fig. 1





PROCEDEU ȘI INSTALAȚIE - STAND PENTRU DETERMINAREA ÎN TIMP REAL A VITEZEI REACȚIEI DE HIDROLIZĂ A AMIDONULUI CU AMILAZE

Invenția se referă la un procedeu și o instalație stand pentru determinarea în timp real, vitezei reacției de hidroliză a amidonului cu amilaze din făina de grâu, utilizând tehnici de interferometrie laser, pe o instalație - stand a cărui principiu de funcționare se bazează pe măsurarea variației indicelui de refracție a unei soluții amidon - amilaze, în timp real, corespunzătoare etapelor de hidroliză a amidonului, din faza de fermentare a aluatului în industria de panificație și în orice domeniu din industria alimentară care utilizează această reacție, în scopul cunoașterii diversilor factori ce o pot influența, a realizării condițiilor practice optime de lucru și a conducerii procesului tehnologic în funcție de calitatea făinii utilizate în producție.

Se cunosc diferite metode și procedee pentru măsurarea și determinarea activității amilazelor precum și a vitezei reacției de hidroliză a amidonului cu amilaze, cum sunt: scăderea vâscozității unei soluții de amidon, scăderea turbidității unei suspensii de amidon, scăderea în intensitate a reacției amidon - iod, creșterea numărului grupărilor reducătoare în mediul de reacție, pentru acest ultim aspect aplicându-se dozarea colorimetrică pe aparatură clasică: colorimetre sau spectrofotometre.

Dezavantajele procedeelelor și metodelor cunoscute sunt legate de instabilitatea sistemelor biochimice, timpul mare de analiză, limitarea domeniului de investigație, presupunând o serie de activități și operații de laborator: pipetări, răcirii, încălziri, termostatări, citiri la aparat pentru fiecare probă în parte, titrări etc, care induc erori sistematice, nefiind posibilă determinarea cu acuratețe a momentului în care reacția de hidroliză s-a terminat sau cunoașterea selectivă, într-o modalitate tehnică continuă, a evoluției procesului de hidroliză sub aspect cantitativ și calitativ.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția se referă la monitorizarea evoluției în timp real a vitezei reacției de hidroliză a amidonului cu amilaze, într-un concept inedit, care utilizează tehnici de interferometrie laser într-un sistem complet integrat, dotat cu un interferometru Michelson și un calculator, la care s-a atașat un senzor vizual matriceal de tip CDD, urmat de prelucrarea imaginilor pe calculator, ansamblu ce măsoară și urmărește variația indicelui de refracție a probei investigate, deci și variația concentrației probei în timp, în scopul conducerii controlate și vizualizării continue a reacției de hidroliză a amidonului cu amilaze, precum și selectarea condițiilor optime de lucru în tehnologia produselor de panificație.

Instalația - stand 1, 2, realizată și utilizată conform invenției, este un sistem complet integrat format din următoarele componente: laserul He - Ne cu lungimea de undă de 632,8 nm, putere de 1 mW 3, lentilă convergentă, elementul divizor (o lamă divizoare), cuvă cu sistemul biochimic 4, oglinzi, lentilă divergentă, ecran pe care se formează franjele de interferență, senzor vizual de tip CCD camera 5, calculator care are integrat și o placă de achiziție a imaginii.

Inteferometrul Michelson utilizat, generează franje de interferență care se formează pe ecranul materializat printr-o coală albă de hârtie, astfel încât senzorul vizual amplasat pe fața opusă a ecranului, achiziționează imaginea în condiții optime. Interpunerea ecranului a fost necesară pentru a nu suprailumina elementele fotosensibile ale senzorului vizual. Imaginea cu franjele de interferență ce apar pe ecranul de proiecție se prezintă ca imagine achiziționată 6, la momentul în care pe ecran a apărut un maxim de interferență și ca imaginea achiziționată la momentul în care pe ecran a apărut un minim de interferență. Se observă că franjele obținute sunt de tip inele Heideger. Indicele de refracție a soluției se schimbă în timp în funcție de modul în care evoluează reacția de hidroliză (scade concentrația substratului și crește concentrația produșilor de hidroliză) și prin urmare se modifică și drumul optic străbătut de către fascicolul semnal al interferometrului. Ca atare, pe ecranul pe care se formează imaginea cu franjele de interferență, se vor observa apariții de noi maxime de interferență, corespunzătoare etapelor de hidroliză. Imaginea formată pe ecran este receptată de către senzorul matriceal CCD 5, și transmisă prin intermediul unei interfețe plăcii de achiziție IP- 8. Senzorul CCD utilizat prezintă o densitate de 10.000 de receptori/mm² distribuiți uniform, iar numărul total de receptori este de 640 x 480.

Programul realizat și elaborat în limbajul C++ oferă posibilitatea achiziționării și prelucrării imaginii binarizate, obținându-se astfel o nouă imagine 7, în zona centrală, în determinarea trecerii de la maxime de interferență la minime și invers (în zona centrală) și în contorizarea numărului de treceri de la maxime la minime și invers.

Viteza de trecere de la maxime de interferență la minime de interferență evidențiază în fapt viteza de reacție a sistemului biochimic.

Din schema logică a programului 8, rezultă că în prima etapă a programului se inițializează parametrii de bază ai plăcii de achiziție (parametrii plăcii de achiziție Matrox IP8). Această etapă este urmată de un test de achiziție de imagine. În cazul în care imaginea

achiziționată nu corespunde din punct de vedere al focalizării, contrastului, al centrării franjelor de interferență pe planul imagine, se corectează aceste aspecte, după care se refăce testul de achiziție. Se comandă achiziția unei imagini, după care se trece la procesarea imaginii, care constă în binarizarea acesteia (tuturor locațiilor cu intensitatea luminoasă peste pragul de binarizare li se atribuie culoarea albă, iar celor care au intensitatea luminoasă sub pragul de binarizare li se atribuie culoarea neagră), căutarea centrului maximului sau minimului de interferență și respectiv notificarea trecerii dintr-o stare de maxim într-una de minim.

Utilizatorul este informat cu o cadență de cinci cadre pe secundă despre următoarele informații: stare curentă (maxim – minim de interferență), număr de treceri prin maxime de interferență de la lansarea programului, timpul scurs de la lansarea acestuia

Pentru a opri programul utilizatorul are următoarele opțiuni: terminarea după un timp prestabilit, terminarea programului după un număr de treceri prin maxime/minime de interferență prestabilit, terminare la comanda operatorului.

Blocul de „Afișare rezultate finale” informează utilizatorul asupra rezultatelor finale ale analizei și anume timpul scurs și numărul de treceri prin maxime/minime de interferență, oferind informații despre corespondența numărului de treceri prin maxime/minime de interferență/ timp scurs prin fișierul de date Rezultate.dat.

Intensitatea de lucru a laserului nu influențează reacția de hidroliză a amidonului. Acest fapt a fost verificat experimental prin studiul comportării sistemului biochimic amidon-amilază la diferite valori de intensitate, viteza reacției de hidroliză fiind nemodificată.

Rezultatul final al procedurii și instalației - stand conform invenției este monitorizarea și măsurarea continuă, în timp real; a vitezei de hidroliză și reprezentarea cineticii enzimatică grafic, 9, 10, ca funcție a numărului de modificări a indicelui de refracție - etape de hidroliză pe ordonată, având pe abscisă timpul de hidroliză în secunde.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele **avantaje**:

- viteza reacției de hidroliză este monitorizată și măsurată continuu, în timp real;
- tehnicile de interferometrie laser pot fi utilizate pentru determinarea vitezei de hidroliză a amidonului și a duratei exacte de hidroliză în orice domeniu al industriei alimentare care utilizează această reacție;
- timpul de analiză este extrem de scurt;

- erorile sistematice de analiză prin măsurători clasice sunt eliminate, afișarea rezultatelor se face pe calculator sub formă de grafic;
- operațiile de pipetări, răcirii, încălziri, termostatări, citiri colorimetrice, titrări etc sunt eliminate;
- are aplicabilitate la analiza sistematică a factorilor exogeni și endogeni de influențare a reacției de hidroliză a amidonului cu amilaze din făina de grâu în scopul eficientizării proceselor biochimice în sistemele date.
- se poate conduce reacția de hidroliză a amidonului în sensul dorit, de activare sau inhibare a reacției de hidroliză, prin variația corespunzătoare a factorilor ce o pot influența, corectându-se astfel calitatea făinii utilizate în panificație.
- procesul enzimatic este modelat pe calculator, în timp real, fiind ușor de interpretat, permițând conducerea controlată și vizualizarea continuă a reacției de hidroliză, precum și selecția condițiilor tehnologice optime de lucru.
- procedeul conform invenției, de determinare a vitezei de reacție utilizând tehnici de interferometrie laser este extrem de sensibil, putând vizualiza reacția de hidroliză pentru concentrații foarte mici de reactanți (ppm);
- procedeul de determinare a vitezei de reacție cu tehnici de interferometrie laser poate fi folosit și pentru analize industriale, fiind ușor de utilizat;
- procedeul și instalația-stand conform invenției, pot fi folosite pentru orice reacție chimică în care indicile de refracție variază în timp, având utilizări în cercetări biochimice din domeniul medical (diagnosticări, determinări enzimatică, studiul medicamentelor asupra activității unor enzime), în domeniul farmaceutic, biotehnologic, etc.

Realizarea invenției este în legătură cu fig.1....10, care reprezintă:

- fig.1. Schema de principiu a sistemului realizat
- fig.2. Imaginea sistemului realizat
- fig.3. Laser He-Ne
- fig.4. Cuva cu proba de analizat amplasată în interferometrul Michelson
- fig.5. Senzorul vizual de tip CCD camera
- fig.6. Imaginea cu inelele Heideger achiziționate de senzorul vizual
- fig.7 Imaginea achiziționată de senzorul vizual după binarizare

-fig.8.Schema logică a programului

-fig.9.Graficul vitezei reacției de hidroliză a amidonului cu amilaze

-fig.10. Influența ionilor de calciu asupra vitezei reacției de hidroliză

Se dau în continuare 2 exemple de realizare a invenției în legătură cu figurile 1-10 care reprezintă procedeul și instalația stand propuse.

Exemplul 1. Determinarea în timp real a vitezei reacției de hidroliză a amidonului cu amilaze endogene din făina de grâu utilizează ca reactivi: amidon solubil Merck 1% în soluție tampon acetat pH 5,5 care conține CaCl_2 0,01M; extract amilazic din făina de grâu: extract apos de făină 10% (durata de extracție fiind de 30 de minute sub agitare continuă cu un agitator magnetic) care a fost centrifugat 5 minute la o turație de 6000 de rotații / minut și apoi diluat de 10 ori în apă distilată.

În cuva aparatului se introduce sistemul biochimic de analizat: soluția de amidon, apă distilată și extractul enzimatic, conform Tabelului 1.

Tabelul1.

Mod de lucru

Reactivi	Volum (ml)	Probă
Amidon	0,5	1
Apa distilată	0,3	2
Extract amilazic	0,2	3

Cuva este poziționată între sistemul de lentile și oglinzi ale interferometrului Michelson, pe direcția de propagare a fascicolului laser 3, astfel încât franjele de interferență formate să fie vizualizate pe ecranul standului de lucru. În momentul introducerii în cuvă a extractului enzimatic, are loc apariția primelor maxime și minime de interferență 6, care sunt vizualizate prin 5 și înregistrate de calculator 1. Rezultatele finale ale analizei (numărul de modificări a franjelor de interferență) sunt reprezentate grafic, având pe abscisă timpul de hidroliză în secunde, iar pe ordonată numărul de modificări a indicelui de refracție - etape de hidroliză. Graficul obținut reprezintă curba vitezei de hidroliză a amidonului cu amilaze, 9.

Exemplul 2. Determinarea influenței ionilor de calciu asupra vitezei reacției de hidroliză a amidonului cu endoamilaze din făina de grâu, utilizează ca reactivi: soluții de amidon solubil

Merck 1% care conțin CaCl_2 în concentrație de 0,01M (proba 1), CaCl_2 0,001M (proba 2) și respectiv CaCl_2 0,0001M (proba 3); soluție amidon martor – amidon solubil Merck 1% care nu conține CaCl_2 ; extract amilazic endogen: extract apos de făină 10% (durata de extracție fiind de 30 de minute sub agitare continuă cu un agitator magnetic) care a fost centrifugat 5 minute la o turație de 6000 de rotații / minut și apoi diluat de 10 ori în apă distilată.

Probele de analizat constând în amestecul de amidon - amilaze (probele 1, 2, respectiv 3) au fost comparate cu o probă martor care conține sistemul biochimic amidon solubil - amilază (fără CaCl_2), conform Tabelului 2.

Tabelul 2.

Mod de lucru

Reactivi	Volum (ml)	Probă
Amidon A* (ml)	0,5	1
Apa distilată (ml)	0,3	2
Extract amilazic (ml)	0,2	3

A*- probele de amidon A1, A2, A3, respectiv martor.

În cuva aparatului se introduc amidonul, apa distilată și extractul amilazic în volumele și concentrațiile prevăzute în Tabelul 2, pentru fiecare probă în parte. În momentul introducerii amilazei în cuvă 4, franjele inițiale ale soluției de amidon, vizualizate pe ecranul de difracție se perturbă și apar modificări de maxime și minime de difracție, datorită inițierii reacției de hidroliză, care sunt automat înregistrate și contorizate de calculator. Când franjele de interferență nu se mai modifică, se întrerupe contorizarea și se prelucrează datele obținute care se reprezintă grafic. Influența concentrației ionilor de calciu asupra activității amilazice din făina de grâu este reprezentată grafic, 10. Se observă faptul că ionul de calciu este un activator amilazic, care mărește viteza reacției de hidroliză a amidonului, efectul cel mai mare obținându-se pentru concentrația de CaCl_2 0,01 M.

23-04-2010

REVENDICĂRI

1. Procedeu și instalație-stand pentru determinarea în timp real a vitezei reacției de hidroliză a amidonului cu amilaze, **caracterizat prin aceea că**, în sistemul biochimic analizat, viteza reacției de hidroliză a amidonului cu amilazele prezente în făina de grâu, a fost monitorizată, determinată și cuantificată prin modificarea indicelui de refracție în timp real, utilizând un sistem complet integrat dotat cu interferometru Michelson, ce pune în evidență apariția franjelor de maximă și minimă interferență, ca urmare a etapelor noi de hidroliză și a modificării drumului optic străbătut de fascicolul semnal al interferometrului, modificare ce este sesizată, achiziționată și prelucrată ca imagine receptată de către senzorul matriceal CCD- dotat cu o densitate de 10.000 de receptori uniform distribuiți pe mm^2 - și transmisă plăcii de achiziție Matrox IP-8 prin intermediul unei interfețe, când se inițializează parametri de bază ai plăcii de achiziție, iar prin procesarea imaginilor achiziționate se oferă posibilitatea contorizării numărului de treceri de la maxime de interferență la minime și invers, viteza de trecere de la maxime de interferență la minime de interferență evidențiind în fapt, viteza de reacție a sistemului biochimic.
2. Procedeu și instalație-stand pentru determinarea în timp real a vitezei reacției de hidroliză a amidonului cu amilaze conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în prima etapă a programului se inițializează parametri de bază ai plăcii de achiziție Matrox IP8, urmată de un test de achiziție de imagine în scopul corectării eventualelor deficiențe de focalizare, contrast și centrarea franjelor de interferență pe planul de imagine, după care se reface testul de achiziție.
3. Procedeu și instalație pentru determinarea în timp real a vitezei reacției de hidroliză a amidonului cu amilaze conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, după inițializarea variabilelor și constantelor din program, cu observația că unele variabile: intensitatea luminoasă, pragul de binarizare, se pot ajusta și în timpul derulării programului, se poate trece la bucla principală a programului, se comandă achiziția unei imagini și se trece la procesarea imaginii.

4. Procedeu și instalație-stand pentru determinarea în timp real a vitezei reacției de hidroliză a amidonului cu amilaze conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, procesarea imaginii achiziționate constă în binarizarea acesteia: tuturor locațiilor cu intensitatea luminoasă peste pragul de binarizare li se atribuie culoarea albă, iar celor care au intensitatea luminoasă sub pragul de binarizare li se atribuie culoarea neagră, căutarea centrului maximului sau minimului de interferență și respectiv notificarea trecerii dintr-o stare de maxim într-una de minim.
5. Procedeu și instalație-stand pentru determinarea în timp real a vitezei reacției de hidroliză a amidonului cu amilaze conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, utilizatorul instalației - stand este informat cu o cadență de cinci cadre pe secundă despre următoarele situații: stare curentă, contorizarea numărului de treceri prin maxime și minime de interferență, timpul scurs de la lansarea programului.
6. Procedeu și instalație-stand pentru determinarea în timp real a vitezei reacției de hidroliză a amidonului cu amilaze conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în momentul introducerii în cuva aparatului a extractului enzimatic, are loc apariția primelor maxime și minime de interferență, vizualizate și înregistrate de calculator, rezultatele finale ale analizei fiind reprezentate grafic ca număr de modificări ale indicelui de refracție - etape de hidroliză, funcție de timpul de hidroliză măsurat în secunde, graficul obținut reprezentând cinetica reacției de hidroliză a amidonului cu amilaze.
7. Procedeu și instalație-stand pentru determinarea în timp real a vitezei reacției de hidroliză a amidonului cu amilaze conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** s-a analizat influența ionilor de calciu asupra vitezei reacției de hidroliză a extractului apos de alfa și beta amilază folosind tehnici de interferometrie laser, utilizând ca substrat enzimatic amidon solubil care conține CaCl_2 de concentrație 0,01M (proba 1), 0,001M (proba 2) și respectiv 0,0001M (proba 3), iar ca enzimă, extractul apos amilazic din făina de grâu, comparat cu o probă martor de amidon solubil fără CaCl_2 ; observându-se prin studiul cineticii reacției de hidroliză în timp real, faptul că ionul de calciu este un activator amilazic, ce determină mărirea vitezei reacției de hidroliză a amidonului, creșterea concentrației ionilor de calciu influențând viteza reacției enzimaticice.

PROCEDEU ȘI INSTALAȚIE - STAND 1

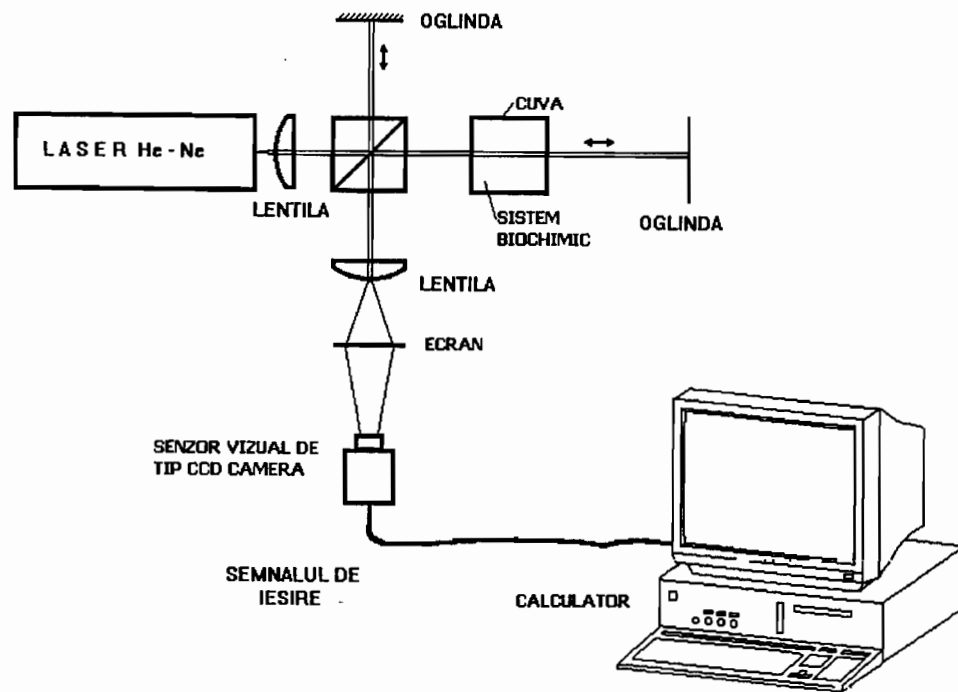


Figura 1. Schema de principiu a sistemului conceput și realizat



Figura 2. Imaginea sistemului conceput și realizat

PROCEDEU ȘI INSTALAȚIE - STAND 2

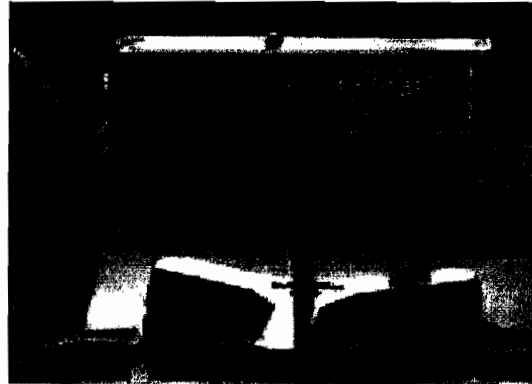


Figura 3. Laser He-Ne

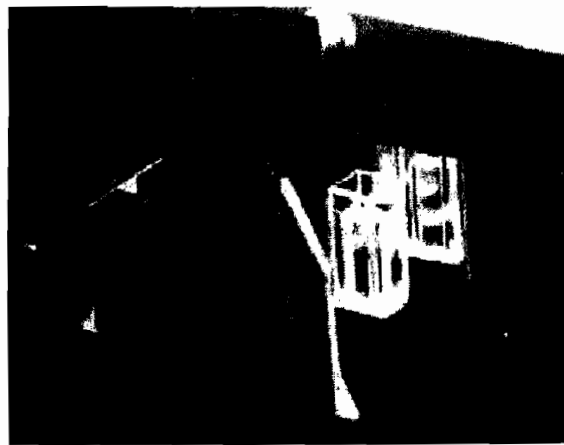
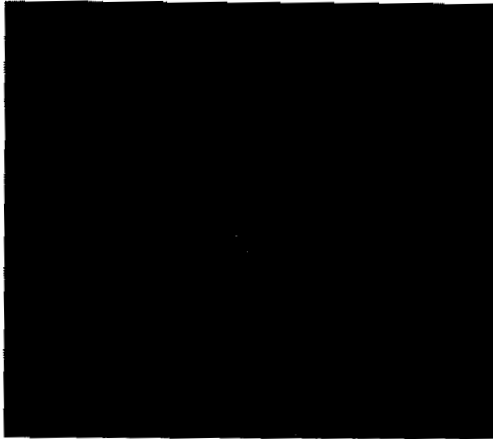


Figura 4. Cuva cu proba de analizat amplasată în interferometrul Michelson



Figura 5. Senzorul vizual de tip CCD camera

PROCEDEU ȘI INSTALAȚIE - STAND 3



a) maxime de interferență



b) minime de interferență

Figura 6. Imaginea cu inelele Heideger achiziționate de senzorul vizual



a) maxime de interferență;



b) minime de interferență

Figura 7. Imaginea achiziționată de senzorul vizual după binarizare

PROCEDEU ȘI INSTALAȚIE - STAND 4

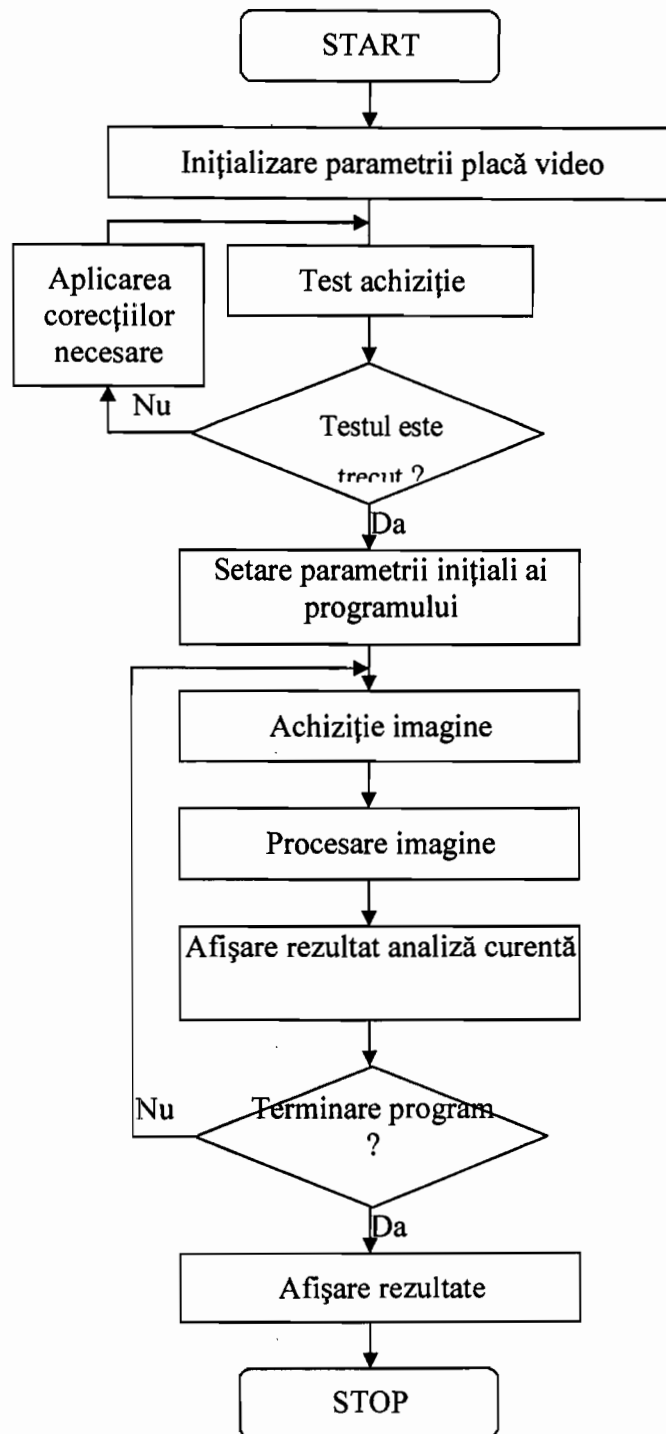


Figura 8. Schema logică a programului utilizat

PROCEDEU ȘI INSTALAȚIE - STAND 5

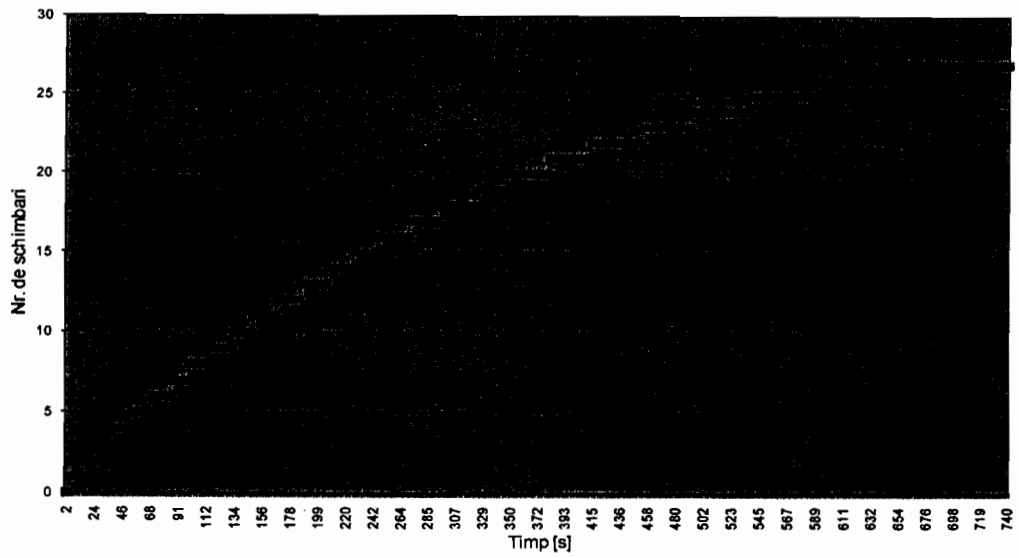


Figura 9. Viteza reacției de hidroliză amidonului cu amilaze endogene

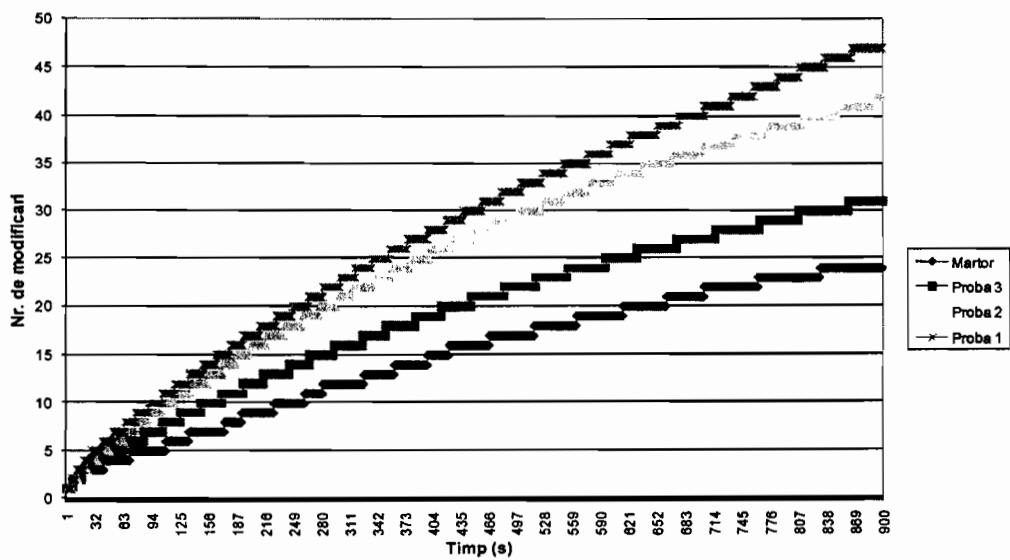


Figura 10. Influența ionilor de calciu asupra vitezei de hidroliză a amidonului cu amilaze