

(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00748

(22) Data de depozit: 07/12/2021

(41) Data publicării cererii:
30/06/2023 BOPI nr. 6/2023

(71) Solicitant:
• CENTRUL INTERNAȚIONAL DE
BIODINAMICĂ,
INTRAREA PORTOCALELOR, NR.1B,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• VASILESCU ALINA MIHAELA,
STR.PETRE ISPIRESCU, NR.9, OTOPENI,
IF, RO;

• LULEA ANDREEA CĂTĂLINA,
STR.BAIA MARE, NR.2, BL.4, SC.B, ET.7,
AP.75, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• BANCIU ROBERTA MARIA, STR.ISTRIEI,
NR.12, BL.19D, SC.2, AP.58, ET.3,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• GASPĂR SZILVESZTER, STR.CEAHLĂUL
NR.20, BL.103, SC.3, ET.5, AP.72,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) METODĂ ȘI KIT DE ANALIZĂ A ACTIVITĂȚII LACAZEI
DIN STRUGURI ÎN VIE BAZAT PE DETECȚIE DUALĂ OPTICĂ
ȘI ELECTROCHIMICĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă și la un kit de determinare duală, optică și electrochimică, a activității lacazei din struguri, pentru verificarea riscului de infecție fungică și de degradare ireversibilă a calității vinurilor. Kitul conform invenției cuprinde un senzor optic din hârtie impregnată cu un substrat enzimatic constând din acidul 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) (ABTS) cuplat cu un sistem de trei electrozi serigrafiați, în care electrodul de lucru este din aur, și cu un cartuş filtrant umplut cu polivinilpolipirrolidonă, preconditionat. Metoda conform invenției se bazează pe detecția electrochimică cantitativă a activității lacazei prin voltametrie ciclică, măsurând activități ale lacazei mai mari de 0.28 U/mL în mai puțin de 3 minute, iar senzorul optic poate fi folosit independent pentru o determinare a activității lacazei în 10 minute.

Revendicări: 6

Figuri: 5

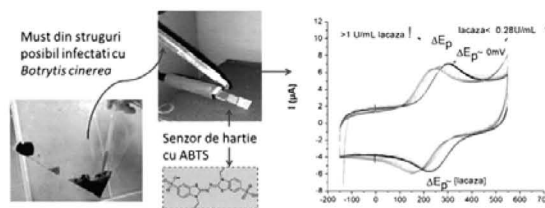


Fig. 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI Cerere de brevet de invenție Nr. <i>a 2021 0748</i> Data depozit <i>07-12-2021</i>
--

45

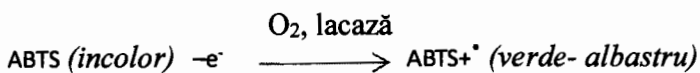
DESCRIEREA INVENTIEI:

Metodă și kit de analiză a activității lacazei din struguri în vie bazat pe detecție duală optică și electrochimică

Inventatori: Vasilescu Alina Mihaela, Lulea Andreea Catalina, Banciu Roberta Maria, Gáspár Szilveszter.

În industria vinului, infecțiile fungice ale strugurilor, din care cea mai notabilă este cea cu *Botrytis cinerea*, afectează drastic calitatea strugurilor și a vinurilor. Între alți parametri de compoziție ai strugurilor care suferă modificări, activitatea lacazei este mărită semnificativ în strugurii afectați de *Botrytis cinerea* și se consideră că peste pragul de 1-3 U lacază /mL must (în funcție de tipul de struguri) riscul de degradare ireversibilă a calității vinurilor respective obținute este foarte mare.[1] Metodele curente de determinare a activității lacazei sunt fie semicantitative, bazate pe teste optice, fie necesită aparatură de laborator și astfel nu pot fi aplicate direct în vie de către personal cu minimă calificare.[2]

Determinarea simplă și rapidă a activității lacazei se poate face folosind reactivul ABTS (acidul 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic), substrat enzimatic al lacazei, pe baza reacției care are loc în prezența oxigenului :



Există câteva kituri de analiză a activității lacazei bazate pe ABTS disponibile comercial cu limită de detecție care coboară la valoarea de 2 mU/mL (de exemplu cele comercializate de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA [3], BioVision, Inc, Milpitas, CA, USA [4]). Acestea însă nu sunt pretabile determinărilor „in-field” de către personal cu minimă instruire, necesitând echipamente de laborator relativ scumpe precum spectrofotometre sau cititoare de plăci. Dias și colaboratorii [5] au descris realizarea unui test pentru măsurarea activității lacazei aplicat pentru identificarea fracțiilor ce conțin lacază la purificarea enzimei extrase din fungi, cu exemplificare în cazul purificării lacazei din *Ganoderma resinaceum*. În acest scop, discuri de hârtie de 6 mm au fost impregnate cu o soluție de ABTS în soluție tampon citrat-fosfat de pH 4 și folosite pentru

de

determinări la cititorul de plăci, măsurătorile de absorbantă la 420 nm fiind făcute la 30° C după 10 minute de incubare. Nu au fost furnizate detalii despre caracteristicile analitice ale metodei, care în condițiile descrise nu este aplicabilă pentru măsurători „in-field”.

Pe de altă parte sunt disponibile comercial teste colorimetrice bazate pe un alt substrat enzimatic al lacazei, siringaldazina, care permit testarea strugurilor fără un echipament sau instruire speciale, în mai puțin de 15 minute, de exemplu testul Dolmar [6] și kitul Laffort Botrytest [7]. Acestea sunt însă semi-cantitative.

În comparație cu metodele optice de analiză, cele electrochimice au avantajul de a permite măsurători în soluții colorate (cum este cel mai des și mustul), sunt mai economice decât multe metode optice, senzorii sunt pretabili miniaturizării iar aparatura portabilă pentru determinări „in-field” e disponibilă comercial la prețuri rezonabile. Zhouari et al au descris o metodă de evaluare a activității lacazei în mustul din struguri infectați cu mucegaiul cenușiu (*Botrytis cinerea*) bazată pe evaluarea electrochimică a consumului de oxigen folosind quinol ca substrat enzimatic. Metoda suferă de interferențe datorită tirozinazei prezente în struguri și implică încălzirea și centrifugarea probelor, nefiind rapidă și aplicabilă „in-field”.[8] Un biosenzor electrochimic pentru detecția infecției strugurilor cu *Botrytis cinerea* a fost dezvoltat pe baza măsurării conținutului de glicerol și acid gluconic. [9] În proiectul european SAFEGRAPE (2009–2011), a fost dezvoltat un dispozitiv de analiză portabil a activității lacazei ca indicator al infecției strugurilor cu *Botrytis cinerea*, bazat pe utilizarea siringaldazinei ca substrat enzimatic electrochimic activ.[10] Acesta nu a fost comercializat și nu există detalii despre realizarea sa în literatura științifică.

Diversii senzori electrochimici bazați pe utilizarea ABTS realizați până în prezent au vizat în principal determinarea capacității antioxidante a vinurilor. [11] Evaluarea activității lacazei prin metode electrochimice folosind ca substrat ABTS a fost puțin studiată [12]. Recent a fost descrisă o metodă amperometrică de determinare a activității lacazei din must în 5 minute, bazată pe utilizarea unei soluții de ABTS și a unui sistem de electrozi serigrafiați cu electrod de lucru din aur.[2] Tratarea mustului cu polivinilpolipirrolidonă (PVPP) este binecunoscută și este aplicată pe scară largă pentru eliminarea compușilor fenolici interferenți și inhibitori ai lacazei înaintea analizei în multe teste spectrofotometrice, fiind aplicată și în studiul menționat mai sus. Metoda amperometrică necesită prepararea unei soluții proaspete de ABTS în laborator și

amestecarea unor volume precise (de exemplu 75 μ L ABTS în soluție tampon acetat pH 4.5 cu 25 μ L probă) pentru a asigura măsurători reproductibile și o capacitate de tamponare a electrolitului suficientă pentru determinări cu acuratețe. Aceste detalii experimentale împiedică utilizarea metodei de către personal necalificat.

Pe de altă parte, combinarea membranelor de hârtie impregnate cu diverși reactivi (enzime, cofactori și/sau mediatori electrochimici) cu senzorii electrochimici, de exemplu în sisteme microfluidice și sisteme de tip „origami” [13,14] sau „kirigami” [15] a adus numeroase avantaje legate de cost, simplitate și rapiditate. Există numeroase astfel de dispozitive descrise în literatură pentru determinarea activității enzimelor sau determinarea inhibitorilor acestora. De exemplu, activitatea acetilcolinesterazei a fost măsurată folosind un substrat enzimativ activ electrochimic adsorbit pe hârtie. [16] În studiul [17] activitatea butirilcolinesterazei este măsurată electrochimic în scopul determinării unor inhibitori ai enzimei, atât enzima cât și substratul fiind adsorbite pe hârtie.

Există de asemenea și câteva brevete de invenție internaționale care descriu metode și sisteme de măsurare a activității enzimatică folosind dispozitive electrochimice bazate pe hârtie, un exemplu ilustrativ fiind sistemul microfluidic bazat pe hârtie, cu detecție electrochimică care conține mai multe zone de reacție pe același substrat, permițând detecția multi-analit, descris în brevetul de invenție [18]. Similar, brevetul de invenție [15] descrie un dispozitiv microfluidic cu detecție electrochimică bazat pe hârtie, pentru determinarea 3-hidroxi-butiratului în sânge. Acest dispozitiv de hârtie tridimensional, de tip « pop-up » (« kirigami ») este compatibil cu glucometrele comerciale și include enzima (3-hidroxi-butirat dehidrogenază), cofactorul enzimatic și mediatorul electrochimic impregnați pe hârtie.

Niciunul din sistemele electrochimice bazate pe hârtie descrise până în prezent nu are ca obiect măsurarea activității lacazei din struguri folosind ABTS sau alt substrat enzimatic.

Între metodele electrochimice de detecție, metodele voltametrice, printre care voltametria ciclică, permit o determinare selectivă pe baza potențialului specific de oxidare/reducere al compusului studiat, precum și o caracterizare a reacțiilor ce au loc la interfața electrod-soluție și a modificărilor aduse suprafeței electrodului. De exemplu, o transformare electrochimică urmată de o reacție chimică poate conduce și la o deplasare a potențialului de pic anodic/catodic din voltametrie ciclică, proporțional cu concentrația compusului studiat. [19]

Prezenta invenție se referă la o metodă și un kit de analiză a activității lacazei din struguri bazat pe detecție duală optică și electrochimică, aplicabile în vie pentru verificarea infecției strugurilor cu fungi precum *Botrytis cinerea*. Metoda se bazează pe combinarea unui senzor optic din hârtie impregnată cu ABTS (substrat al lacazei) cu un electrod serigrafat de Au, detecția electrochimică făcându-se prin voltametrie ciclică.

Principiul metodei (Figura 1, Principiul metodei de măsurare electrochimică a activității lacazei) constă în transformarea enzimatică a ABTS de către lacază în volumul unui senzor de hârtie impregnat cu ABTS, în contact cu o celulă electrochimică din 3 electrozi serigrafiați coplanari și măsurarea variației potențialului de pic anodic/catodic al ABTS prin voltametrie ciclică. Senzorul de hârtie impregnat cu ABTS se colorează în urma reacției enzimatică care duce la formarea cationului radical $ABTS^{+\bullet}$ astfel încât senzorul de hârtie poate fi folosit și independent de determinarea electrochimică. Senzorul de hârtie plasat pe suprafața unui sistem de 3 electrozi serigrafiați, funcționează ca un rezervor de ABTS și electrolit (după aplicarea probei) și asigură difuzia ABTS către suprafața electrodului de lucru. La baleierea potențialului aplicat în celula electrochimică prin voltametrie ciclică într-un interval de potențial adecvat se observă transformarea electrochimică a ABTS în cationul radical $ABTS^{+\bullet}$ și viceversa. Datorită rezervorului limitat de ABTS conținut în senzorul de hârtie și a mediului poros de difuzie în celula electrochimică, transformarea enzimatică a ABTS sub acțiunea lacazei (din mustul de struguri), care are loc la suprafața electrodului simultan cu reacția electrochimică, este observată ca o deplasare a potențialului de pic anodic și catodic ale ABTS. Deplasarea potențialului de pic anodic sau catodic pe parcursul a 10 cicluri de baleiaj de potențial este proporțională cu activitatea lacazei din proba de analizat și reprezintă parametrul analitic care stă la baza metodei electrochimice de măsură a activității lacazei descrise în această invenție.

Conform acestei invenții, kitul de măsură include senzorul optic din hârtie impregnată cu mediatorul electrochimic ABTS și chitosan, un sistem de 3 electrozi serigrafiați în care electrodul de lucru este din aur și un cartuș filtrant umplut cu polivinilpolipirolidona. Kitul mai include o pungă pentru zdrobirea strugurilor și o pipetă de plastic pentru aplicarea probei (Figura 2, Componentele kitului pentru analiza lacazei din struguri). Senzorii se folosesc împreună cu un

potențostat portabil legat la un laptop/tabletă, echipat cu software adecvat de colectare și analiză a datelor electrochimice, disponibile comercial din mai multe surse.

Scopul invenției este de a obține un sistem analitic dual optic/electrochimic capabil să genereze într-un mod rapid un răspuns proporțional cu activitatea lacazei din must, suficient de simplu de folosit pentru a fi utilizabil direct în podgorie și cu cost redus. Sistemul este realizat prin utilizarea unei hârtii impregnate cu ABTS ca mediu de difuzie a substratului enzimatic în celula de 3 electrozi serigrafiați și folosind voltametria ciclică precum metodă de detecție.

Problema vizată de către invenția de față, este realizarea unui procedeu simplu de măsură a activității lacazei din struguri aplicabilă în vie de către personal cu minimă instruire și care să permită evaluarea riscului de degradare ireversibilă a calității vinului prin decelarea activității lacazei cu o sensibilitate (sub un prag) de 1 U/mL.

Metoda, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- Permite realizarea de măsurători cantitative sensibile și rapide în mai puțin de 5 minute (incluzând pregătirea probei) a activității lacazei din struguri. Metoda este adecvată pentru determinarea riscului de degradare ireversibilă a vinurilor corespunzător unui prag limită al activității lacazei de 1 U/mL. Limita de detecție este de 0.28 U/mL lacază, iar timpul necesar unei măsurători electrochimice este de 2.5 minute.
- Senzorul optic de hârtie poate fi utilizat independent, caz în care timpul necesar unei determinări semicantitative este de 10 minute.
- Senzorul optic cu ABTS prezintă o stabilitate mărită comparativ cu o soluție de ABTS folosită în mod tipic în măsurătorile de activitate enzimatică a lacazei
- Sensibilitate marită și dublă confirmare a rezultatelor, diminuând erorile comparativ cu senzorii cu un singur mod de detecție, optic sau electrochimic.
- Simplitate a modului de pregătire a probelor, rapiditate și compatibilitate cu utilizarea în vie de către personal cu minimă calificare.

Se oferă în continuare, un exemplu de realizare a senzorului optic și a cartușului filtrant din compoziția kitului de analiză a activității lacazei.

Senzorul optic este obținut prin impregnarea unei hârtii de filtru cu viteză de filtrare/porozitate medie (de exemplu celuloza cu domeniu de retenție 5-8 μm , ROTILABO® Tip 113A de la Carl

Roth GmbH) cu un amestec de ABTS și chitosan (0.25-1 mg/mL chitosan și 0.2-0.8 mg/mL ABTS) în soluție tampon acetat 0.1 M pH 4.5. Impregnarea se realizează prin imersarea hârtiei de filtru în acest amestec timp de 20 de minute, urmată de clătire în soluția tampon acetat 0.1 M pH 4.5 și uscare în aer. Utilizarea chitosanului în amestec cu ABTS duce la creșterea sensibilității determinărilor, comparativ cu impregnarea senzorului exclusiv cu ABTS.

Cartușul filtrant este obținut prin transferul unei cantități de aproximativ 150 mg polivinilpolipirolidona (de exemplu Divergan, număr de catalog Merck, Germania 1.07302 sau echivalent) într-o seringă de plastic de 1 mL. Cartușul este condiționat în prealabil prin filtrarea unui volum de 1mL de tampon acetat 0.1 M pH 4.5 urmată de uscare.

Conform metodei și unui mod de aplicare tipic (Figura 1, Principiul metodei de măsurare electrochimică a activității lacazei), se plasează un senzor de hârtie pe suprafața sistemului de electrozi serigrafiați și se cuplează electrozii la potențostat, setându-se parametrii experimentali de voltametrie ciclică. Boabele de struguri se zdrobesc într-o pungă și cu o pipetă de plastic se transferă aproximativ 0.6-1 mL din mustul obținut în cartușul filtrant. Se filtrează mustul transferând două picături pe senzorul de hârtie și se pornește măsurătoarea. La sfârșitul măsurătorii se determină potențialele picurilor de curent corespunzătoare oxidării și reducerii ABTS (Epa și Epc) pentru primul și al 10-lea ciclu de baleiaj, și se calculează variația potențialului de pic anodic, respectiv catodic dintre primul și al 10-lea ciclu, $\Delta E_{pa(10-1)}$ și $\Delta E_{pc(10-1)}$. Se interpoolează rezultatele pe curba de calibrare stabilită în prealabil, obținându-se activitatea lacazei din proba de struguri analizată. Culoarea senzorului de hârtie se compară după măsurătoarea electrochimică cu cea înregistrată în prealabil, pentru același timp de reacție cu soluții standard de lacază de diverse activități pentru o dublă confirmare a rezultatelor. Pentru musturi cu activitate mică a lacazei este necesară observarea culorii senzorului de hârtie la 10 minute de la aplicarea probei de must. În aceste condiții, senzorul de hârtie poate fi în mod avantajos folosit și independent de testarea electrochimică, la dorința utilizatorului, pentru a verifica dacă activitatea lacazei este mai mare sau mai mică față de pragul critic de 1 U/mL.

Caracterizarea sistemului de analiză și demonstrarea aplicației metodei și kitului la măsurarea activității lacazei din struguri s-a făcut prin teste electrochimice și optice.

Într-o primă exemplificare a principiului metodei și pentru demonstrarea utilității sale la măsurarea activității lacazei au fost realizate teste de voltametrie ciclică în prezența lacazei folosind senzorul de hârtie impregnată cu ABTS și soluții de lacază de diverse concentrații. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 3 (Figura 3. A : Voltamograme ciclice înregistrate în prezența unei soluții de tampon acetat 0.1 M pH 4.5 (albastru) și respectiv în prezența unei soluții de lacază 8 U/mL (roșu), în domeniul de la -150 la +550 mV, la o viteză de 100 mV/s pentru 10 cicluri. Negru: voltamograme înregistrate în prezența lacazei folosind un senzor de hârtie fără ABTS. B : Curba de calibrare reprezentând variația diferenței dintre potențialul picului anodic/catodic dintre ciclul 1 și ciclul 10 în funcție de activitatea lacazei din probă). Rezultatele indică variația potențialului picului anodic spre valori mai mici cu creșterea numărului de cicluri (a timpului) și corelația dintre această variație și activitatea lacazei din soluția analizată. De exemplu, valorile tipice de potențial anodic și catodic ale ABTS înregistrate cu sistemul optic/electrochimic în absența lacazei sunt de 298 ± 16.1 mV și respectiv 229 ± 12.9 mV vs Ag/AgCl (n=5 teste) și variază nesemnificativ (4.4 și 7.4 mV în medie) pe parcursul a 10 cicluri de baleiaj. În prezența unei soluții de lacază cu activitate 8 U/mL, potențialul picului anodic al ABTS variază între primul și al 10-lea ciclu de la 270 ± 2.3 mV la 241 ± 3.5 , iar cel al picului catodic de la 175 ± 4.4 mV la 149 ± 2.9 mV (n=5).

Într-o a doua exemplificare a aplicării invenției s-a realizat măsurarea optică semicantitativă a activității lacazei folosind senzorul de hârtie impregnată cu ABTS.

Pentru a verifica sensibilitatea detecției exclusiv optice folosind hârtia impregnată cu ABTS, pe senzorii de hârtie s-au plasat 50 μ L soluție de lacază de diverse activități de la 0 la 8 U/mL. Senzorii au fost fotografiați după 2.5 minute (corespunzător timpului necesar experimentelor cu detecție prin voltametrie ciclică) și respectiv după 10 minute. Rezultatele obținute (Figura 4, Măsurarea activității lacazei cu senzorul de hârtie după un timp de reacție de 2.5 și respectiv 10 minute) indică faptul că după 2.5 minute nu se pot decela activități mai mici de 4 U/mL.

Aceasta subliniază avantajele în ceea ce privește sensibilitatea metodei bazate pe detecția prin voltametrie ciclică. După 10 minute de reacție, cu senzorii de hârtie pot fi detectate activități de 1.2 U/mL lacază și mai mari. Acest fapt conferă versatilitate sistemului de detecție propus, astfel încât dacă utilizatorul dorește o evaluare semicantitativă sau un test limită pentru a determina

dacă proba are sub sau peste 1 U/mL lacază, poate utiliza exclusiv senzorul optic, măbind timpul de reacție enzimatică la 10 minute.

Într-o a 3-a exemplificare a metodei și sistemului de analiză descris, se demonstrează posibilitatea măsurării electrochimice a activității enzimatică a lacazei din musturi (Figura 5, Voltamograma ciclică înregistrată pentru o probă de must în care s-au adăugat 12 U/mL lacază, obținută folosind sistemul de detecție bazat pe combinația senzor de hârtie-electrozi serigrafiați de Au. Domeniul de baleiaj : de la -150 mV la +550 mV vs Ag/AgCl, viteza de scanare 100mV/s, 10 cicluri). În acest scop s-au analizat probe de must în care s-a adăugat intenționat lacază (în mustul obținut din struguri sanatoși activitatea lacazei este nesemnificativă).

A fost urmat modul de utilizare al kitului de analiză descris mai sus. Pe scurt, s-a plasat un senzor de hârtie pe suprafața sistemului de electrozi serigrafiați conectați la potențiostat. Strugurii au fost zdrobiți, la 985 μ L de must s-au adăugat 15 μ L de soluție de lacază 800 U/mL pentru a obține un must ce conține 12 U/mL lacază. Acest must a fost trecut prin cartușul filtrant cu PVPP, condiționat în prealabil prin filtrarea a 1 mL de soluție de tampon acetat pH 4.5. S-au aplicat 2 picături de must filtrat prin PVPP pe senzorul de hârtie și a fost demarată măsurătoarea de voltametrie ciclică. După 10 cicluri de baleiaj de potențial care au durat aproximativ 2.5 minute s-a măsurat potențialul picurilor anodic și catodic pentru ciclul 1 și ciclul 10 și s-au calculat diferențele de potențial între ciclul 1 și ciclul 10 pentru picul anodic și respectiv catodic (ΔE_{pa} și ΔE_{pc}). Variația de potențial de pic anodic/catodic din proba de must analizată a fost similară celei înregistrate pentru o soluție de lacază de activitate 12 U/mL, calculându-se un factor de recuperare mediu de 92.9% și 93.7% (n= 10 teste) pe baza variației potențialului de pic anodic, respectiv catodic.

În urma testelor putem concludiona:

Metoda, conform invenției înlătură dezavantajele altor procedee de măsurare a activității lacazei (precum selectivitate și sensibilitate inadecvate și complexitate prea mare pentru utilizarea în podgorie de către personal cu minimă calificare) prin utilizarea senzorului de hârtie impregnată în locul unei soluții de ABTS la testarea electrochimică prin voltametrie ciclică. Substratul enzimatic ABTS solubil și activ electrochimic este adecvat pentru măsurarea activității lacazei prin metoda propusă conform invenției. Preconționarea senzorului de hârtie

impregnată cu ABTS a cartușului filtrant cu PVPP în tampon acetat pH 4.5 asigură tamponarea eficientă a probei de must de struguri astfel încât activitatea lacazei din must să poată fi măsurată cu acuratețe. Sensorul optic poate fi utilizat independent pentru o evaluare cantitativă a activității lacazei în 10 minute. Metoda electrochimică este adecvată pentru măsurarea activității lacazei în struguri în mai puțin de 5 minute (incluzând timpul de pregătire a probelor și testarea electrochimică care durează 2.5 minute). Metoda și kitul nu necesită utilizarea de aparatură și ustensile de laborator sau etape de diluție a probelor, metoda fiind simplă, aplicabilă pentru măsuratori în vie (cu aparatură electrochimică portabilă) de operatori cu minimă instruire. Metoda și kitul permit analiza cantitativă rapidă a activității lacazei în domeniul relevant pentru evaluarea riscului de infecție fungică și degradare ireversibilă a calității vinurilor.

Referințe bibliografice

1. Grassin, C.; Dubourdieu, D. Quantitative determination of *Botrytis* laccase in musts and wines by the syringaldazine test. *J. Sci. Food Agric.* **1989**, *48*, 369–376.
2. Gáspár, S; Branduse E; Vasilescu, A, Electrochemical evaluation of laccase activity in must, *Chemosensors* **2020**, *8*(4), 126; <https://doi.org/10.3390/chemosensors8040126>
3. MyBioSource, San Diego, USA, Laccase Assay Kit, Micromethod Catalog No: MBS779938, 2020. Available online: <https://www.mybiosource.com/assay-kits/laccase/779938>
4. BioVision Inc. Laccase Activity Assay Kit (Colorimetric), Catalog #: K2038 2020. Available online: <https://www.biovision.com/laccase-activity-assay-kit-colorimetric.html>
5. Dias, A.A; Matos, A.J.S; Fraga, I; Sampaio, A; Bezerra, R.M.F, An Easy Method for Screening and Detection of Laccase Activity, *The Open Biotechnology Journal*, 2017, *11*, 89-93, DOI: 10.2174/1874070701711010089
6. Dolmar DetectionKit, Study of Botrytis Cinerea and Grape Juice Oxidability, Dolmar, Haro, Spain. Product information. Disponibil online: <https://www.laboratorysuppliesandreagents.com.au/test-kits/dolmar-laccase-test-kits/>.
7. Laffort Botrytest Kit, Laffort, France. Product Information. Disponibil online: https://la_ort.com/wp-content/uploads/FP/FP_EN_botrytest.pdf
8. Zouari, N.; Romette, J.-L.; Thomas, D. Continuous-flow estimation of laccase activity in rotten grape juice by a computerized electrode. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, *40*, 195–201
9. Cinquanta, L.; Albanese, D.; de Curtis, F.; Malvano, F.; Crescitelli, A.; di Matteo, M. Rapid Assessment of Gray Mold (*Botrytis cinerea*) Infection in Grapes with a Biosensor System. *Am. J. Enol. Vitic.* **2015**, *66*, 502.
10. SAFEGRAPE Consortium. Final Publishable Summary Report, Biosensor Based Instrumentation to be Used in Vineyards and Wineries for Fast and Sensitive Detection of Botrytis Cinerea (Grey Rot) in Grapes (SAFEGRAPE), 2011. Available online: <https://cordis.europa.eu/project/id/232453/reporting>

11. Magalhães, L.M.; Santos, M.; Segundo, M.A.; Reis, S.; Lima, J.L.F.C. Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. *Talanta* **2009**, *77*, 1559–1566.
12. Klis, M.; Rogalski, J.; Bilewicz, R. Voltammetric determination of catalytic reaction parameters of laccase based on electrooxidation of hydroquinone and ABTS. *Bioelectrochemistry* **2007**, *71*, 2–7.
13. Arduini, F; Cinti, S; Caratelli, V; Amendola, L; Palleschi, G; Moscone, D, Origami multiple paper-based electrochemical biosensors for pesticide detection, *Biosens. Bioelectron*, 126,2019, 346-354,<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.014>.
14. Cinti, S., Moscone, D. & Arduini, F. Preparation of paper-based devices for reagentless electrochemical (bio)sensor strips. *Nat Protoc.* *14*, 2437–2451 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0186-y>
15. Brevet de inventie „Three-dimensional microfluidic devices with pop-up feature”, WO 2016/161430 A1/6.10.2016, inventatori Chien-Chung Wang si George Whitesides
16. Panraksa, Y; Siangproh, W; Khampieng, T; Chailapakul, O; Apilux, A Paper-based amperometric sensor for determination of acetylcholinesterase using screen-printed graphene electrode, *Talanta*, 178,2018, 1017-1023, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.096>.
17. Cinti, S; Minotti, C; Moscone, D; Palleschi, G; Arduini, F, Fully integrated ready-to-use paper-based electrochemical biosensor to detect nerve agents, *Biosens. Bioelectron*, 93,2017, 46-51, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.091>.
18. Brevet de inventie „Microfluidic devices for multiplexed electrochemical detection”, US 9,594,051 B2/14.03.2017, inventatori: George M. Whitesides, Xiujun Li, Frederique Deiss, Zhihong Nie, Xinyu Liu
19. Siu, J.C; Sauer, G.S; Saha, A; Macey, R.L.; Fu, N; Chauviré, T; Lancaster, K.M; Lin, S, *J. Am. Chem. Soc* **2018** *140* (39), 12511-12520, DOI: 10.1021/jacs.8b06744.

REVEDICĂRI

1. **Metoda de analiză cantitativă a activității lacazei din struguri** bazata pe cuplarea unui senzor optic de hârtie impregnată cu ABTS cu un sistem de electrozi serigrafiați de Au și detecție prin voltametrie ciclică.
2. **Kit pentru analiză duală a activității lacazei din struguri** având drept componente principale un senzor de hârtie impregnată cu ABTS, sistem de electrozi serigrafiați de Au și un cartuș filtrant cu PVPP, preconționat.
3. Metoda de analiză cantitativă a activității lacazei din struguri în condițiile revendicării 1, **se caracterizează prin aceea că** permite măsurarea cantitativă a activității lacazei mai rapidă și cu sensibilitate mai mare comparativ cu metoda amperometrică folosind soluție de ABTS.
4. Kitul de analiză a activității lacazei din struguri în condițiile revendicării 2, **se caracterizează prin aceea că** permite detecția optică semicantitativă a lacazei precum și detecția electrochimică, cantitativă prin utilizarea unui potențiostat portabil cu interfață grafică și software adecvate disponibile comercial.
5. Metoda de analiză cantitativă a activității lacazei din struguri în condițiile revendicării 1, **se caracterizează prin aceea că** permite măsurarea cantitativă a activității lacazei cu o limită de detecție de 0.28 U/mL în 2.5 minute fiind adecvată pentru evaluarea riscului de infecție fungică cu *Botrytis cinerea* în struguri.
6. Metoda de analiză cantitativă a activității lacazei din struguri în condițiile revendicării 1 și kitul de analiză a activității lacazei din struguri în condițiile revendicării 2 **se caracterizează prin aceea că** pot fi utilizate în vie sau în punctele de procesare a strugurilor de către operatori cu minimă instruire.



Desene (5)

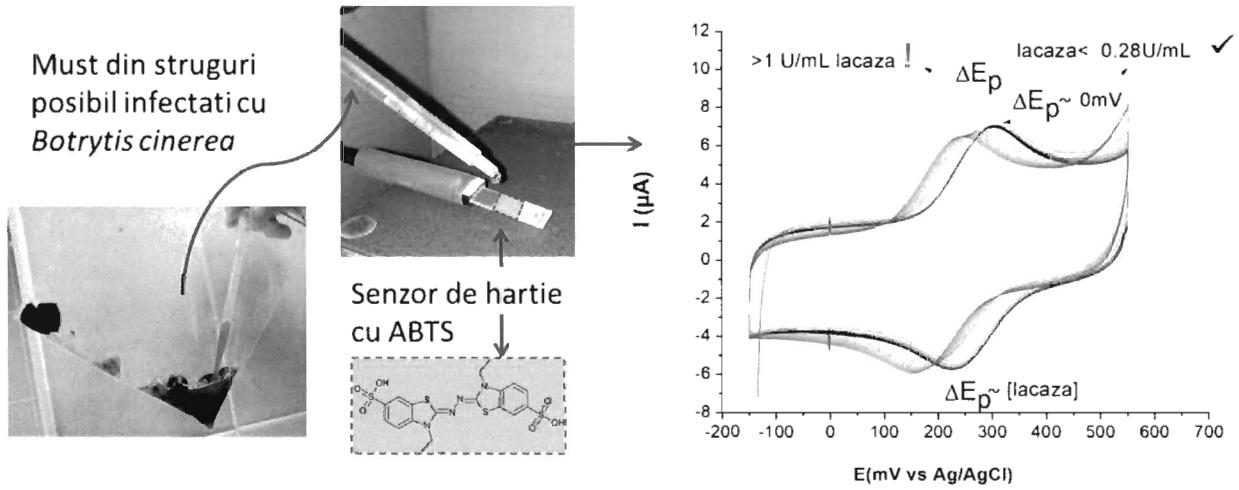


Figura 1. Principiul metodei de măsurare electrochimică a activității lacazei

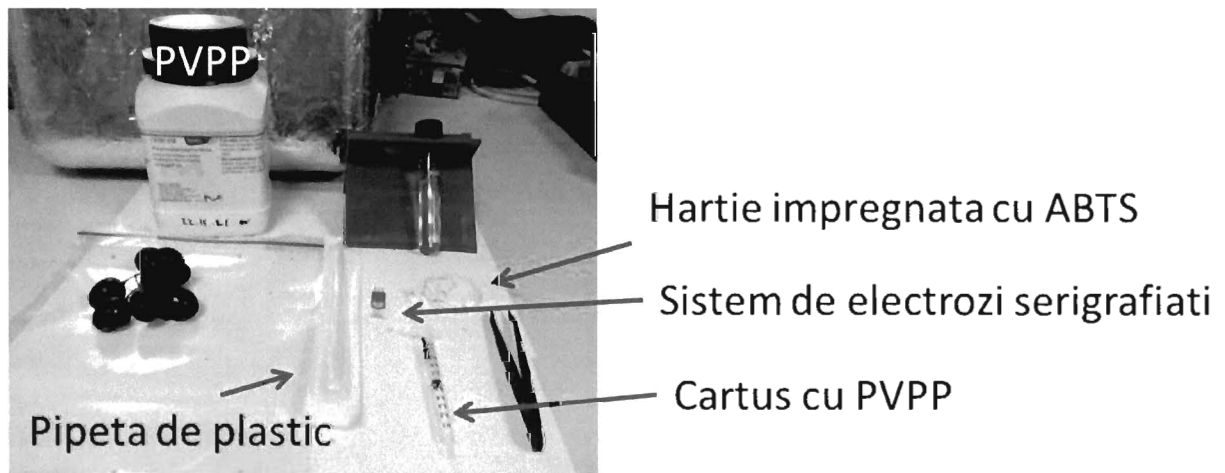


Figura 2. Componentele kitului pentru analiza lacazei din struguri

Signature

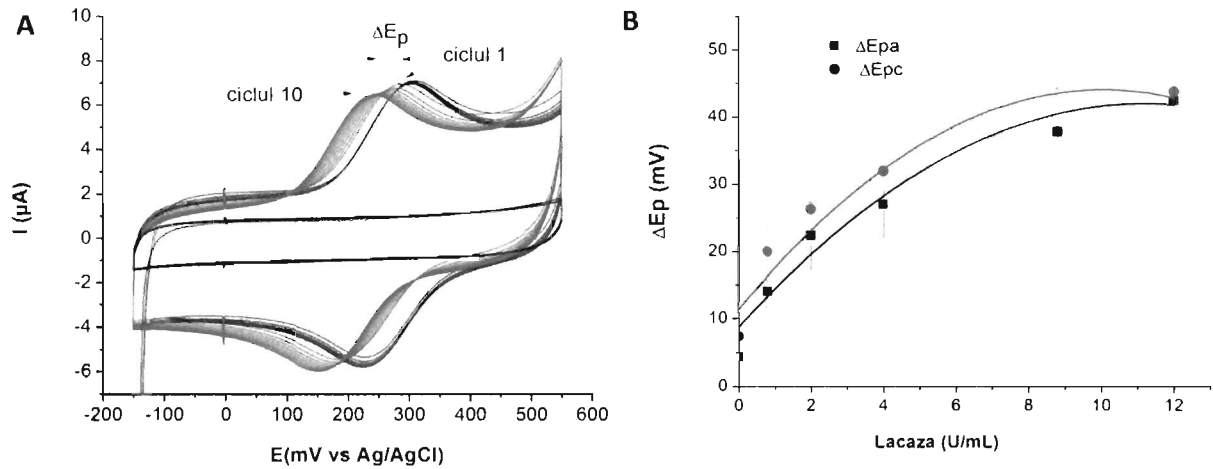
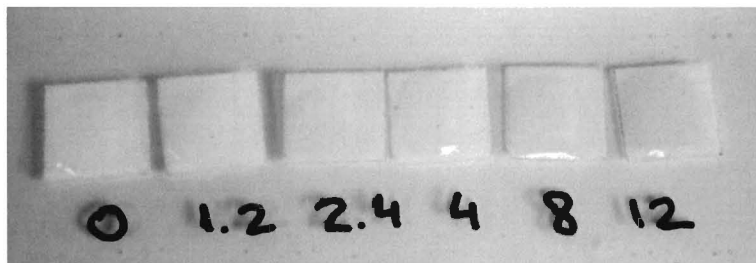
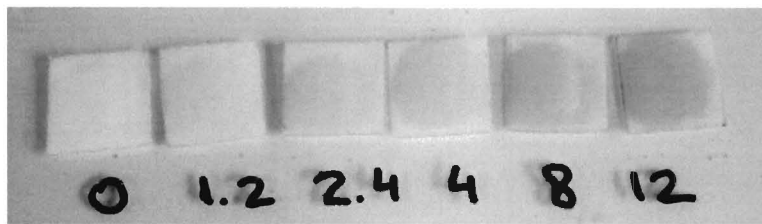


Figura 3 A : Voltamograme ciclice înregistrate în prezența unei soluții de tampon acetat 0.1 M pH 4.5 (albastru) și respectiv în prezența unei soluții de lacază 8 U/mL (roșu), în domeniul de potențiale de la -150 la +550 mV, la o viteză de scanare de 100 mV/s pentru 10 cicluri. Negru: voltamograme înregistrate în prezența lacazei folosind un senzor de hârtie fără ABTS. B : Curba de calibrare reprezentând variația diferenței dintre potențialul picului anodic/catodic dintre ciclul 1 și ciclul 10 în funcție de activitatea lacazei din proba



Dupa 2.5 min



Dupa 10 min

Activitate lacaza

Figura 4. Măsurarea activității lacazei cu senzorul de hârtie după un timp de reacție de 2.5 și respectiv 10 minute

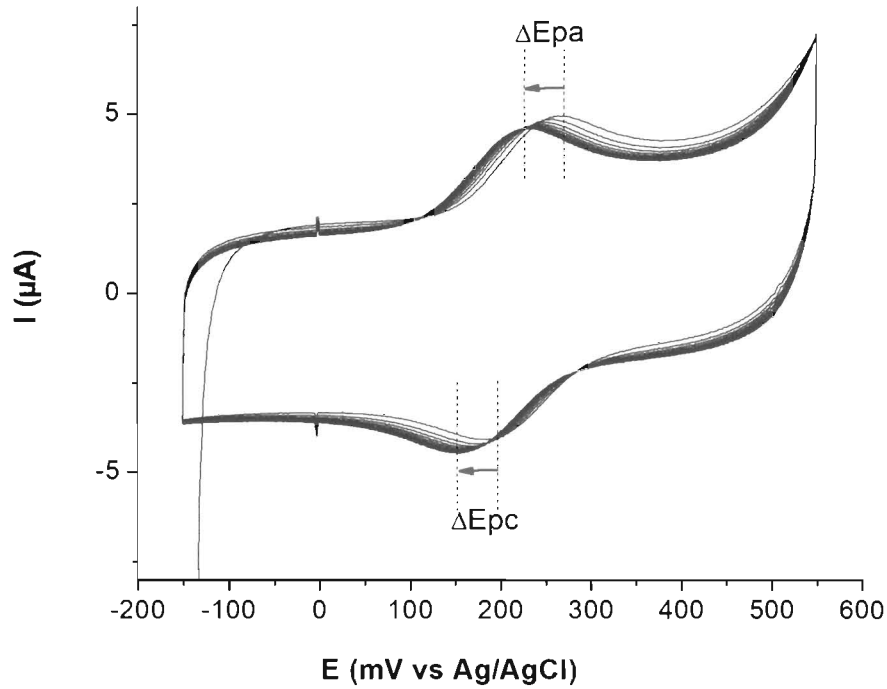


Figura 5. Voltamograma ciclică înregistrată pentru o probă de must în care s-au adăugat 12 U/mL lacază, obținută folosind sistemul de detecție bazat pe combinația senzor de hârtie-electrozi serigrafiați de Au. Domeniul de baleiaj : de la -150 mV la +550 mV vs Ag/AgCl, viteza de scanare 100mV/s, 10 cicluri