



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2021 00673**

(22) Data de depozit: **09/11/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2023 BOPI nr. **5/2023**

(71) Solicitant:
• **INCDO-INOE 2000, FILIALA INSTITUTUL
DE CERCETĂRI PENTRU
INSTRUMENTAȚIE ANALITICĂ
CLUJ-NAPOCA, STR. DONATH NR.67,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:
• **KOVACS EMOKE DALMA,
STR. AL. VLAHUȚĂ, BL. N4, NR. 31, SC. 2,
AP. 37, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **KOVACS MELINDA HAYDEE,
STR. AL. VLAHUȚĂ BL. N4, NR. 31, SC. 2,
AP. 37, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **ROMAN CECILIA, STR. PIAȚA ABATOR,
BL. B, AP. 5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(54) **METODĂ DE DETERMINARE A AMINOZAHARURILOR
DIN SOL REZULTATE ÎN URMA HIDROLIZEI
CHITOLIGOZAHARIDELOR CATALIZATE DE ENZIMA
N-ACETIL-BETA D-GLUCOZAMINIDAZĂ**

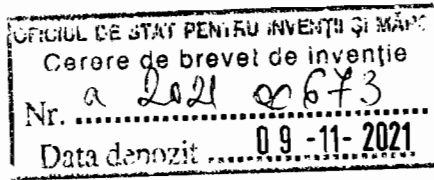
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă analitică de determinare în ultraurme a aminozaharurilor glucozamina, manozamina, galactozamina și acid muramic din sol rezultate în urma hidrolizei chitooligozaharidelor catalizate de enzima N-acetil-βD-glucozaminidaza (NAG). Metoda, conform invenției, constă în etapele: pregătire a probelor de sol prin liofilizare și omogenizare, extracție prin hidroliză în mediu acid timp de 10 h la 105°C, purificare extracte prin filtrare, evaporare a extractului filtrat colectare a reziduurilor, derivatizare aminozaharuri cu

un mix de agenți de derivatizare cu separarea fazei organice care este supusă analizei gaz-cromatografie cu detector de ionizare cu flacără CG-FID, rezultând informații exacte privind activitatea NAG în sol, metoda având o limită de cuantificare în domeniul 1,22...3,76 μg x kg⁻¹, precizie în domeniul 2,8...5,9% și un domeniu de aplicare de 10...1000 μg x kg⁻¹.

Revendicări: 1





METODA DE DETERMINARE A AMINOZAHARURILOR DIN SOL REZULTATE IN URMA HIDROLIZEI CHITOLIGOZAHARIDELOR CATALIZATE DE ENZIMA N-ACETIL- β D-GLUCOZAMINIDAZA

DESCRIERE

Inventia se refera la o metoda de determinare a aminozaharurilor din sol rezultate in urma hidrolizei chitooligozaharidelor catalizate de enzima n-acetil- β d-glucozaminidaza. Metoda propusa este o metoda analitica de determinare in ultraurme a aminozaharurilor glucozamina, manozamina, galactozamina si acid muramic din sol rezultate in urma hidrolizei chitooligozaharidelor catalizate de enzima N-acetil- β D-glucozaminidaza (NAG). NAG este una dintre cele trei enzime care catalizeaza hidroliza chitinei. Aceasta hidroliza este importanta in ciclul azotului (N) in sol deoarece participa la procesele prin care chitina este convertita in aminozaharuri care sunt sursa majora de azot mineralizabil in sol.

Enzimele digestive microbiene din sol si materia organica sunt studiate inca din anii 1950, dar intelegerea acestor enzime ca factori determinanti ai proceselor ecosistemice (ex. ciclul biogeochimic al carbonului C, azotului N, fosforului P) este in continuare ingreunata de diferentele metodologice si analitice existente intre cercetatori si laboratoare, diferente datorate echipamentului analitic detinut si a metodei proprii aplicate [1, 2, 3, 4]. Cercetarile asupra enzimelor digestive microbiene s-au concentrat in mod traditional pe izolarea si caracterizarea de noi proteine pentru potentiale aplicatii industriale [5, 6].

Progresul lent in dezvoltarea metodelor de analiza a activitatilor enzimactice a limitat intelegerea diversitatii activitatilor enzimactice si a specificitatii substratului. Abia incepand cu anii 1990 se inregistreaza progrese semnificative privind metodele analitice aplicate enzimelor din sol fapt care a condus la o crestere a numarului de enzime studiate [7, 8, 9]. In mod particular, metodele analitice care utilizeaza substraturi fluorescente conjugate cu colorant ca 4-metilumbeliferona (MUB) sau 7-amino-4-metilcumarina (AMC) au devenit mai populare deoarece permit o determinare mai rapida a unui numar extins de enzime care controleaza ciclul biogeochimic al C, N si P. De cele mai multe ori aceste

metode se aplica pe microplaci si ofera un randament crescut fie a numarului de analize fie a numarului de enzime determinate, metode care pot fi realizabile intr-un timp relativ scurt [10, 11].

Chiar si asa, inca exista decalaje semnificative ale acestor metode analitice ceea ce afecteaza atat calitatea cat si utilitatea datelor, de exemplu, aceeaasi activitate enzimatica poate fi testata in soluri din habitate diferite dar, din cauza diferentelor de substrat utilizat, concentratiei substratului, masei solului si a modului de calculul, activitatile enzimatic determinate prezinta diferente semnificative in studii diferite [8, 9, 10, 11]. Astfel de diferente impiedica posibilitatea realizarii de generalizari ample privind activitatile enzimatic in probele de sol, in diferite conditii.

In strainatate, una dintre metodele cele mai des aplicate pentru analiza activitatii NAG in mediile naturale este utilizarea substratului N-acetilglucozaminidaza legat de p-nitrofenol (pNP) [12, 13]. Aceasta metoda care utilizeaza substraturi legate de pNP a fost dezvoltata initial pentru a detecta activitatea fosfatazei din sol, dar ulterior a fost extinsa si pentru determinarea activitatii altor enzime precum celobiohidrolaza, chitinaza, glucozidaza, xilozidaza, leucin aminopeptidaza, glicin aminopeptidaza sau tripsin peptidaza [14, 15, 16]. Metoda se bazeaza pe analiza colorimetrica a unui produs final, p-nitrofenol, care este eliberat atunci cand substratul artificial este hidrolizat de enzima corespunzatoare. Acest p-nitrofenol este cuantificat ulterior la 400 – 410 nm.

O alta metoda alternativa frecvent aplicata pentru determinarea activitatii NAG este cea dezvoltata initial pentru a evalua activitatea extracelulara a glucozidazei in mediile acvatice [17]. Aceasta metoda utilizeaza substratul N-acetil- β D-glucozaminida legat de 4-metilumbeliferona (MUB). Compusul final eliberat (4-metilumbeliferona) este un compus fluorescent cu o excitare/emisie in jurul valorii 360/460 nm. In prezent pe langa N-acetil- β D-glucozaminida este disponibila comercial o gama larga de alte substraturi artificiale legate de MUB [18, 19] ceea ce permite determinarea fluorometrica a activitatii unui numar mai mare de enzime (ex. β D-fucozida, β D-manopiranozida, β D-lactopiranozida, α L-arabinofuranozida, α D-galactopiranozida, etc.) pe langa metodele clasice colorimetrice care utilizeaza substraturi pNP (anterior mentionate).

Dezavantajul acestor metode (pNP-vizibil, MUB-fluorescenta) este dat de faptul ca:

- analizele enzimatic pe probele de sol dau informatii despre activitatea enzimatica „potential maxima” si nu dau informatii privind ratele reale ale reactiilor catalizate enzimatic („activitatea realizata”) in sol;
- ca in cazul oricarei metode analitice biochimice de tip *in situ*, si in cazul analizei activitatii enzimatic, metoda de analiza (pNP-vizibil, MUB-fluorescenta) necesita optimizarea si adaptarea conditiilor de caz (proba): pH, temperatura, substrat utilizat, durata de incubare, omogenitate proba, diluarea omogenatului de proba, etc.

In tara sunt putine studii care se axeaza pe determinarea activitatilor enzimatic implicate in ciclul azotului. Cele mai des raportate sunt studiile legate de activitatea enzimatica a ureazei care catalizeaza hidroliza ureei formand ca produse finali amoniac si dioxid de carbon [8, 10].

Scopul prezentei inventii este de dezvolta o metoda analitica noua de analiza a produsilor finali rezultati in urma hidrolizei chitooligozaharidelor catalizate de enzima NAG – aminosaharurile: glucozamina, manozamina, galactozamina, si acid muramic, obtinand astfel informatii privind ratele reale ale reactiilor catalizate enzimatic. Aminosaharurile catalizate de enzima NAG sunt determinate din probele de sol prin gaz cromatografie cu un detector cu ionizare in flacara (GC-FID) in urma etapelor de extractie, purificare si derivatizare.

Problemele tehnice pe care le rezolva inventia sunt:

- *obtinerea de informatii privind produsii finali rezultati in urma activitatii NAG:* cu metoda care face obiectul prezentei cereri de inventie se obtin informatii despre activitatea realizata de NAG si anume, informatii despre produsii finali rezultati si nu despre „potentiala activitate” a acestei enzime.

Originalitate si noutate metoda:

- ofera informatii cantitative despre activitatea realizata de NAG: produsii finali rezultati – glucozamina, manozamina, galactozamina, si acid muramic;
- nu necesita adaptarea metodei la proprietatile fizico-chimice ale fiecărei probe de sol in parte;

- permite analiza unui numar mare de probe cu un cost redus, deoarece este eliminata utilizarea substraturilor enzimaticice care in majoritatea cazurilor sunt foarte scumpe.
- permite analiza unui numar mare de probe intr-un timp redus (aproximativ 25 probe/20 h)
- permite stocarea atat a probelor de sol cat si a extractelor pentru un timp indelungat fara modificarea continutului de aminozaharuri (conditii de stocare - 20 °C, timp de stocare proba 30 zile, timp de stocare extract 30 zile)

Modul de lucru pentru analiza aminozaharurilor dintr-o proba de sol prin aplicarea metodei propusa pentru brevetare:

Metoda propusa permite analiza cantitativa prin gaz cromatografie (GC-FID) a glucozaminei, manozaminei, galactozaminei si al acidului muramic, produsii finali rezultati in urma activitatii NAG din probe de sol. Etapele principale ale acestei metode sunt: pregatire proba sol, extractie, purificare extract, derivatizare aminozaharuri, analiza GC-FID. Probele prelevate se pot pastra timp de 30 zile la -20 °C fara ca acesti compusi sa sufere modificari.

Etapa de pregatire a probelor de sol pentru analiza aminozaharurilor rezultate in urma activitatii NAG implica liofilizarea si omogenizarea probei de sol propusa spre analiza.

Etapa de extractie: se cantaresc intre 5...10 g proba de sol liofilizat si omogenizat. Pentru hidroliza acida se adauga intre 5...15 mL 6M HCl. Reactia de hidroliza acida are loc timp de 10 h la 105 °C.

Etapa de purificare a extractelor implica urmatoorii pasi: dupa procesul de hidroliza extractul acid este filtrat cu ajutorul unei palnii de separare. Extractul filtrat se evaporata la 45 °C cu ajutorul unui rotavapor. Se resuspenda reziduul obtinut in urma procesului de evaporare cu 5 mL de apa. Pentru o colectare cat mai eficienta a reziduurilor, se utilizeaza o baie de ultrasunete pentru 1...3 min. Extractul apos nou obtinut se ajusteaza la un pH de 6.7 cu 1M KOH. Acest extract se liofilizeaza astfel incat intreg lichidul sa fie indepartat. Se resuspenda reziduurile obtinute in urma procesului de liofilizare cu 1...3 mL metanol. Din nou, pentru o colectare cat mai eficienta a reziduurilor obtinute se poate utiliza baia de ultrasunete pentru 1...3 min. Extractul cu metanol se

centrifugeaza pentru 5...10 min. Metanolul se indeparteaza la 45 °C cu ajutorul unui rotavapor.

Etapa de derivatizare se realizeaza pe reziduurile astfel obtinute dupa cum urmeaza: se prepara un mix de agenti de derivatizare care contine: $\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$ (30 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) si $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2$ (40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) in piridina:metanol (3:1 v/v). Din acest mix de agenti de derivatizare se adauga un volum de 150...450 μL la extractul de reziduuri obtinut si se vortexeaza timp de 30 sec. Extractul se pune in etuva la o temperatura cuprinsa intre 70...100 °C pentru o durata de 30...60 min. Dupa aceasta perioada de incubare se adauga un volum de 500...1000 μL de $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ si se continua incubarea timp de 30 min la o temperatura cuprinsa intre 70...100 °C. Dupa a doua etapa de incubare se adauga la extractul rezultat un volum de 1...2 mL diclormetan si un volum de 1...2 mL 1m HCl. Acest mix se vortexeaza la 300 rpm timp de 60 sec. Se permite separarea fazei organice de faza apoasa dupa care faza apoasa se indeparteaza.

Analiza gaz cromatografica: faza organica astfel obtinuta este data la rotavapor pentru indepartarea solventului (45 °C). Extractul obtinut se amesteca cu un volum de 100...500 μL mix acetat de etil:hexan (1/1 v/v) dupa care este analizat gaz-cromatografic cu un detector cu ionizare in flacara (GC-FID). Conditile de analiza gaz cromatografica sunt prezentate in Tabelul 1.

Tabelul 1. Parametrii de lucru GC-FID

Parametru	Valori de analiza
<i>Coloana cromatografica</i>	Coloana capilara cu faza stationara 5 % fenil 95 % metil-polisiloxan. 30 m x 0.25 mm I.D. x 0.25 μm f.t.
<i>Program cuptor cromatografic</i>	100 °C (3 min) urmata de o crestere a temperaturii pana la 250 °C cu 10 °C \cdot min ⁻¹ . Se mentine temperatura de 250 °C timp de 3 min dupa care se aplica o noua crestere cu 20 °C \cdot min ⁻¹ pana la temperatura de 265 °C. Aceasta temperatura se mentine constanta timp de 3 min dupa care este

	urmata de o noua crestere cu 20 °C·min ⁻¹ pana la temperatura de 285 °C. Aceasta temperatura finala se mentine constanta timp de 5 min. Gaz purtator He (6.0) cu debit constant de 0.5 mL·min ⁻¹ .
<i>Parametrii injector</i>	Injector cu splitare Rata de splitare: 30:1 Temperatura injector: 250 °C
<i>Parametrii detector</i>	Detector cu ionizare in flacara Temperatura detector: 300 °C Debit aer sintetic: 400 mL·min ⁻¹ Debit hidrogen (gaz make up): 30 mL·min ⁻¹ Debit azot: 30 mL·min ⁻¹

Parametrii de performanta ai metodei de determinare prin gaz cromatografie a produsilor finali (aminozaharuri) rezultati in urma activitatii NAG sunt:

- domeniu de aplicare: 10 – 1000 µg·kg⁻¹
- limita de cuantificare: glucozamina 1.22 µg·kg⁻¹, manozamina 2.86 µg·kg⁻¹, galactozamina 1.96 µg·kg⁻¹ si acid muramic 3.76 µg·kg⁻¹
- acuratete: glucozamina 96.5 %, manozamina 107.8 %, galactozamina 113.2 % si acid muramic 82.4 %
- precizie: glucozamin 3.4 %, manozamina 5.9 %, galactozamina 2.8 % si acid muramic 4.9 %
- incertitudine: glucozamina 9.4 %, manozamina 12.8 %, galactozamina 7.5 % si acid muramic 3.6 %

Avantajele metodei

Metoda propusa pentru analiza cantitativa prin gaz-cromatografie (GC-FID) a produsilor finali rezultati in urma activitatii NAG din probe de sol este o metoda eficienta care permite cuantificarea glucozaminei, manozaminei, galactozaminei si a acidului muramic. Prin aceasta metoda se obtin informatii exacte despre activitatea realizata de NAG in sol. Comparativ cu alte metode aceasta metoda este mai:

- **exacta**: determina exact ratele reale ale reactiilor catalizate de NAG in sol („activitatea realizata”) – produsii rezultati glucozamina, manozamina, galactozamina si acidului muramic;
- **eficienta**: elimina necesitatea de a adapta metoda la parametrii fizico-chimici al fiecarei probe de sol; durata de analiza este mult mai redusa (aproximativ 25 probe/20 h)
- **avantajoasa** din punct de vedere al costului: utilizeaza solventi organici comuni; nu este necesara utilizarea substraturilor enzimaticice care sunt foarte scumpe
- **accesibila**: nu este necesara analiza imediata a probelor prelevate, permite stocarea probelor si al extractelor (-20 °C, timp de stocare proba 30 zile, timp de stocare extract 30 zile)

Referinte bibliografice:

1. Sun B., Miller G., Lee W.Y., Ko K., Crowe M.A., Partridge L. Analytical method development for directed enzyme evolution research: A high throughput high-performance liquid chromatography method for analysis of ribose and ribitol and a capillary electrophoresis method for the separation of ribose enantiomers. *Journal of Chromatography A*, 1271(1):163-169, 2013.
2. Virkki L., Maina N.H., Johansson L., Tenkanen M. New enzyme-based method for analysis of water-soluble wheat arabinoxylans. *Carbohydrates Research*, 343(3), 521-529, 2008.
3. Mekasha S., Toupalova H., Linggadjaja E., Tolani H.A., Andera L., Arntzen M.Q., Vaaje-Kolstad G., Eijsink V.G.H., Agger J.W. A novel analytical method for d-glucosamine quantification and its application in the analysis of chitosan degradation by a minimal enzyme cocktail. *Carbohydrate Research*, 433:18-24, 2016.
4. Jiaojiao J., Yangyang G., Gangying Z., Yanping C., Wei L., Guohua H. d-Glucose, d-Galactose, and d-Lactose non-enzyme quantitative and qualitative analysis method based on Cu foam electrode. *Food Chemistry*, 175:485-493, 2015.
5. Ghosh S., Kamble N.U., Majee M. A protein repairing enzyme, PROTEIN L- ISOASPARTYL METHYLTRANSFERASE is involved in salinity stress tolerance by increasing efficiency of ROS-scavenging enzymes. *Environmental and Experimental Botany*, 180, 104266, 2020.
6. Mudgil P., Kilari B.P., Kamal H., Olalere O.A., Fitzgerald R.J., Gan C.Y., Maqsood S. Multifunctional bioactive peptides derived from quinoa protein hydrolysates: Inhibition of α -glucosidase, dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin I converting enzymes. *Journal of Cereal Science* 96, 103130, 2020.
7. Yadav A.N., Kour D., Kaur T., Devi R., Yadav A., Dikilitas M., Abdel-Azeem A.M., Ahluwalia A.S., Saxena A.K. Biodiversity, and biotechnological contribution of beneficial soil microbiomes for nutrient cycling, plant growth improvement and nutrient uptake. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 102009, 2021.
8. Burke D.J., Weintraub M.N., Herwins C.R., Kalisz S. Relationship between soil enzyme activities, nutrient cycling and soil fungal communities in a northern hardwood forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(4):795-803, 2011.

9. Xu H., Yu M., Cheng X. Abundant fungal and rare bacterial taxa jointly reveal soil nutrient cycling and multifunctionality in uneven-aged mixed plantations. *Ecological Indicators*, 129, 107932, 2021.
10. Wang H., Wu C., Chen D., Liu H., Sun X., Zhang S. Changes in soil carbon and nutrients and related extracellular enzymes in successive rotations of Japanese larch plantations. *Catena*, 204, 105386, 2021.
11. Sun X., Ye Y., Ma Q., Guan Q., Jones D.L. Variation in enzyme activities involved in carbon and nitrogen cycling in rhizosphere and bulk soil after organic mulching. *Rhizosphere*, 19, 100376, 2021.
12. Mori T., Aoyagi R., Kitayama K., Mo J. Does the ratio of β -1,4-glucosidase to β -1,4-*N*-acetylglucosaminidase indicate the relative resource allocation of soil microbes to C and N acquisition? *Soil Biology and Biochemistry*, 160, 108363, 2021.
13. Palacios D., Busto M.D., Ortega N. Study of a new spectrophotometric end-point assay for lipase activity determination in aqueous media. *LWT-Food Science and Technology*, 55(2):536-542, 2014.
14. Singh D., Schaaper R.M., Hochkoepler A. A continuous spectrophotometric enzyme-coupled assay for deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolases. *Analytical Biochemistry*, 496:43-49, 2016.
15. Do V.H., Tran P.L., Ni L., Park K.H. A continuous coupled spectrophotometric assay for debranching enzyme activity using reducing end-specific α -glucosidase. *Analytical Biochemistry*, 492:21-26, 2016.
16. Mutaguchi Y., Ohmori T., Sakuraba H., Yoneda K., Doi K., Ohshima T. Visible wavelength spectrophotometric assays of l-aspartate and d-aspartate using hyperthermophilic enzyme systems. *Analytical Biochemistry*, 409(1):1-6, 2011.
17. Zhao L., Lin J.M. Development of a micro-plate magnetic chemiluminescence enzyme immunoassay (MMCLEIA) for rapid- and high-throughput analysis of 17 β -estradiol in water samples. *Journal of biotechnology*, 118(2):177-186, 2005.
18. Guo Y., Wang H., Chen Z., Jing X., Wang X. Determination of methomyl in grain using deep eutectic solvent-based extraction combined with fluorescence-based enzyme inhibition assays. *Spectrochimica A Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 266, 120412, 2022.
19. Zhang Y., Wu Y., Liu L., Wang W., Zhang W., Song D., Wang X., Su R. A dual-signal sensing platform based on nanosheet materials for ratiometric fluorescence and colorimetric detection of enzyme activities in human blood. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 346, 130531, 2021.

REVEDICARE

Metoda de determinare a aminozaharurilor din sol rezultate în urma hidrolizei chitooligozaharidelor catalizate de enzima N-acetil- β D-glucozaminidaza, o metoda analitica rapida, simpla si sensibila **caracterizata prin aceea ca** determina în ultraurme ratele reale ale reactiilor catalizate de enzima N-acetil- β D-glucozaminidaza (NAG) în sol, si anume aminozaharurile precum glucozamina, manozamina, galactozamina si acid muramic din sol rezultate în urma hidrolizei chitooligozaharidelor catalizate de enzima NAG aplicând extracția acida cu un volum de 5...15 mL 6M HCl, purificare prin ultrasonare si evaporare a solventilor, derivatizare cu un volum cuprins între 150...450 μ L de mix de agenti de derivatizare (30 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ $\text{HONH}_2\cdot\text{HCl}$ si 40 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2$ în piridina:metanol 3:1 v/v), urmata în final de analiza gaz cromatografica cu un detector cu ionizare în flacara a aminozaharurilor catalizate de NAG, cu urmatorii parametri de performanta: *domeniu de aplicare*: 10 – 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; *limita de cuantificare*: glucozamina 1.22 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, manozamina 2.86 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, galactozamina 1.96 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ si acid muramic 3.76 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; *acuratete*: glucozamina 96.5 %, manozamina 107.8 %, galactozamina 113.2 % si acid muramic 82.4 %; *precizie*: glucozamin 3.4 %, manozamina 5.9 %, galactozamina 2.8 % si acid muramic 4.9 % si *incertitudine*: glucozamina 9.4 %, manozamina 12.8 %, galactozamina 7.5 % si acid muramic 3.6 %.