



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00669

(22) Data de depozit: 08/11/2021

(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. VLĂHUȚĂ 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 OBTINERE A ARILSULFATAZEI
DIN MICROBIOTA SOLULUI

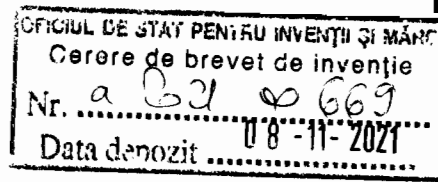
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a aril-sulfatazei extracelulare din microbiota solului. Metoda, conform invenției, constă în etapele: izolare și creștere a mixului de microorganisme izolate din sol, de preferință sol de pășune, cu incubarea microorganismelor din mediu la 37°C, timp de 12...48 h și colectarea coloniilor semnificative în solubilizarea sulfului, fermentarea microorganismelor într-un mediu de fermentare

timp de 1...5 zile, colectarea depunerii organice din fermentator care este supusă unui proces de purificare pe coloane seriale dietilaminoetil sepharosa-schimb anionic, rezultând enzima arilsulfatază extracelulară purificată având o activitate în domeniul 4,8...31 mU x mL⁻¹.

Revendicări: 1





METODA DE OBTINERE A ARILSULFATAZEI DIN MICROBIOTA SOLULUI

DESCRIERE

Inventia se refera la o metoda de obtinere a arilsulfatazei extracelulare din microbiota solului.

In ultimii ani tehnologiile din diferite domenii industriale realizeaza pasi seriosi in inlocuirea substantelor chimice cu cele de origine biologica. Enzimele sunt biocatalizatori necesari tuturor organismelor vii pentru realizarea sintezelor precum si pentru desfasurarea unor reactii de degradare si descompunere specifice din sol. Enzimele sunt molecule dinamice cu rol de biocatalizatori si multe reactii chimice (adesea poluatoare) au fost inlocuite cu procese biologice ecologice prin utilizarea acestor biocatalizatori [1]. Enzimele avand o natura foarte specifica au capacitatea de a revolutiona sectorul industrial [2].

Sulfatazele sunt o familie heterogena de enzime care constituie un grup de proteine importante din punct de vedere biologic si industrial. Ele au rol critic in procesul de hidroliza a gruparilor cu sulfat din biomoleculele sulfatate [3].

Sulfur (S) este o componenta critica pentru cresterea si dezvoltarea plantelor si, implicit si pentru animale care le consuma. Diferite domenii industriale precum si managementul agricol intensiv aplicat din ultimele decenii au condus la o disponibilitate redusa a sulfurului pentru procesele de dezvoltare a plantelor. Deficienta de sulf disponibil din sol determina intarzierea maturizarii plantelor, conduce la aparitia clorozei in productiile agricole sau la oprirea dezvoltarii plantelor. In majoritatea solurilor agricole, sulfurul anorganic este semnificativ mai putin abundent decat sulfurul legat organic. Compusii organici care contin sulf sunt in majoritatea cazurilor indisponibili plantelor. Sulfatii de ester constituie cea mai importanta rezerva organica de sulf in solurile aerobe, reprezentand aproximativ 70 % din concentratia de sulf totala din astfel de soluri [2, 3]. Prin urmare, compusii organici cu sulf trebuie sa fie transformati prin hidroliza biochimica a esterilor de sulfat sau prin mineralizarea microbiologica a sulfurului legat de carbon pentru a elibera gruparea SO_4^{2-} care poate fi asimilata de plante. Hidroliza esterilor de sulfat

aromatic este catalizata de sulfatazele localizate periplasmatic care scindeaza sulfatul din fragmentele de molecule de sulf organic.

Arilsulfataza (EC 3.1.6.1) este o clasa de glicosulfohidrolaze implicata in desulfatarea polizaharidelor sulfatate. Aceasta enzima catalizeaza hidroliza legaturilor arilsulfat-ester rezultand in compusi arili si sulfat anorganic. Arilsulfatazele se gasesc intr-o gama larga de organisme (bacterii, fungii, etc.) iar structurile lor primare sunt similare intre ele, chiar si atunci cand provin din specii diferite [4, 5].

In strainatate obtinerea arilsulfatazei se bazeaza pe procese de fermentare care utilizeaza microorganisme monoculturi de *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella* si *Serratia*. Acestea microorganisme sunt fie izolate din medii naturale fie sunt modificate genetic [6, 7, 8, 9]. Conform literaturii de specialitate studiate se mentioneaza ca in majoritatea cazurilor din aceste microorganisme s-a obtinut arilsulfataza intracelulara si mai putin arilsulfataza extracelulara (arilsulfataza intracelulara este obtinuta din materia celulara iar arilsulfataza extracelulara se obtine din spatiul periplasmatic, extern membranei celulare)

Principalele dezavantaje ale acestor tehnologii cu obtinere arilsulfataza intracelulara de sunt [5, 7, 8, 9]:

- arilsulfataza intracelulara este mult mai dificil de obtinut si costisitor de purificat comparativ cu arilsulfataza extracelulara;
- obtinerea micoorganismelor modificate genetic utilizate pentru producerea de arilsulfataza este un procedeu laborios si costisitor in acelasi timp;
- identificarea microorganismelor care pot contribui semnificativ la productia arilsulfatazei este o activitate consumatoare de timp, iar izolarea si cresterea microorganismelor identificate este extrem de dificila.

In tara, studii care se adreseaza arilsulfatazei se refera doar la determinarea activitatii enzimaticice din diferite matrici de proba (biologice sau mediu) [10, 11, 12] si nu se mentioneaza metode pentru obtinerea acesteia. Din cunostinta noastra nu au fost realizate studii care sa se ocupe de obtinerea arilsulfatazei.

Scopul prezentei inventii este de a dezvolta o metoda noua, originala de obtinere a arilsulfatazei extracelulare din microbiota solului. Pentru aceasta se utilizeaza un mix de microorganisme izolate din sol (in special, sol de pasune). Prezenta cerere de brevet

de inventie prezinta detaliat modul de izolare a mixului de microorganisme din sol si conditiile de crestere a acestora, obtinerea arilsulfatazei extracelulare si modul de purificare a acesteia prin coloane seriale.

Problemele tehnice pe care le rezolva inventia sunt:

- *eliminarea etapei de identificare si izolare microorganisme optime pentru obtinerea de arilsulfataza*: prin utilizarea unui mix de microorganisme sunt indepartate problemele ridicate de identificarea microorganismelor optime acestui proces (consumator de timp) si de izolarea si cresterea acestor microorganisme (proces dificil care necesita echipamente de inalta performanta, personal inalt calificat, conditii speciale de lucru);
- *purificarea enzimei obtinute*: se propune o tehnica noua si anume utilizarea unor coloane seriale care reduce semnificativ costurile purificarii arilsulfatazei obtinute.

Originalitate si noutate:

- obtinerea arilsulfatazei extracelulare diminueaza complexitatea etapei de separare si purificare a enzimei urmarite comparativ cu cazul in care se obtine arilsulfataza intracelulara;
- utilizarea de microorganisme naturale reduce costurile asociate pentru obtinerea microorganismelor modificate genetic;
- utilizarea unui mix de microorganisme reduce semnificativ durata procesului (prin eliminarea etapei de identificare si izolare a microorganismelor, facand procesul de obtinere a arilsulfatazei extracelulare optim) si creste randamentul de obtinere a arilsulfatazei (mai multe colonii de microorganisme pot genera o cantitate mai mare de arilsulfataza).

Modul de lucru pentru obtinerea arilsulfatazei extracelulare: Prezenta metoda care face subiectul cererii de brevet de inventie propune obtinerea arilsulfatazei extracelulare utilizand un mix de microorganisme izolate din sol (recomandat - sol de pasune). Etapele procesului de obtinere a arilsulfatazei extracelulare sunt:

1. izolarea si cresterea mixului de microorganisme extrase din sol;
2. obtinerea arilsulfatazei extracelulare;
3. purificarea arilsulfatazei extracelulare.

1. Etapa de izolare si crestere a mixului de microorganisme extrase din sol (pasune): aceasta etapa implica extractia microbiotei dintr-o masa m de sol si cresterea acesteia intr-un mediu artificial dupa cum urmeaza:

1.1 Se ia o masa m de sol de pasune proaspat prelevata (mentinuta la $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ din momentul prelevarii pana in momentul in care se ajunge cu proba in laborator) peste care se adauga un amestec/mediu lichid compus din: $8.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 , $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl , $0.1\text{...}1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl , $0.1\text{...}1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.01\text{...}0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 , $0.01\text{...}0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 , $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KI , $0.5\text{...}3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$

1.2 Microorganismele din acest mediu (pct. 1.1) sunt incubate la $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pentru o durata de timp t pana cand se obtine o densitate optica acceptabila in domeniul $0.8\text{...}2$ la 600 nm

1.3 Pe un mediu solid de agar la care s-a adaugat o masa m_1 de CuSO_4 , $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ si $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sterilizat se realizeaza testul activitatii arilsulfatazei. Incubarea are loc pentru $12\text{...}48\text{ h}$ la o temperatura intre $35\text{...}37^{\circ}\text{C}$.

1.4 Coloniile semnificative in solubilizarea sulfului sunt colectate si transferate intr-un nou recipient care contine un amestec format din: $8.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 , $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl , $0.1\text{...}1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl , $0.01\text{...}0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 , $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KI , $0.5\text{...}3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$

2. Etapa de obtinere a arilsulfatazei extracelulare:

2.1 Din mediul cu microorganisme obtinut la finalul etapei 1.4 se transfera un volum V ml intr-un mediu de fermentare care contine: 3% NaCl , 0.3% $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1% KCl , 0.02% CaCl_2 , 0.01% $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.002% $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.01\text{...}0.1\%$ $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.01\text{...}0.1\%$ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0.25 agar, 0.2% drojdie, 0.5% peptona. pH-ul solutiei este setat la 7.5 .

2.2 Procesul de fermentare are loc la $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, intr-o centrifuga la o viteza de rotatie de $100\text{...}1000\text{ rpm}$ pentru o durata de timp de $1\text{...}5$ zile

2.3 Se colecteaza depunerea organica din fermentator si se supune unui proces de centrifugare (4500 rpm timp de $10\text{...}60\text{ min}$)

2.4 Depunerea organica obtinuta la finalul etapei **2.3** este suspendata in 25 mM buffer Tris-HCl cu un pH 6...7 la care se mai adauga intre 0.1...1 mM PMSF si 0.1...1 % Triton X-100.

3. Etapa de purificare a arilsulfatazei extracelulare: Solutia obtinuta impreuna cu depunerea organica rezultata in etapa anterioara 2.4 se supune unui proces de purificare. Etapa de purificare a arilsulfatazei rezultata in etapa 2.4 se realizeaza pe coloane seriale dupa cum urmeaza:

3.1 In prima etapa de purificare a arilsulfatazei extracelulare se utilizeaza o coloana de dietilaminoetil sepharosa; in prealabil coloana este conditionata cu un volum V_i mL de solutie Tris-HCl (10...100 Mm, pH 7.5)

3.2 Extractul obtinut in etapa **2.4** se trece prin coloana de dietilaminoetil sepharosa dupa care se spala coloana cu solutia tampon utilizata ca solutie de conditionare

3.3 Extractul semi-purificat obtinut in etapa 3.2 se trece printr-o coloana de schimb anionic care in prealabil a fost conditionata cu o solutie tampon Tris avand o concentratie de 10...100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

3.4 Extractul nou purificat, rezultat in 3.3 se centrifugheaza la 7000 rpm timp de 10 min

3.5 Supernatantul se arunca iar enzima sedimentata, arilsulfataza extracelulara, este colectata.

3.6 Enzima arilsulfataza obtinuta astfel, purificata, se stocheaza la -80°C .

Activitatea enzimei purificate – arilsulfataza extracelulara – a fost analizata utilizand un substrat fluorescent conjugat cu colorant 4-metilumbeliferona (MUB) la o excitare/emisie in jurul valorii de 360/460 nm. Valorile obtinute au variat in domeniul 4.8 – 31 $\text{mU}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Avantajele metodei:

Cu metoda care face subiectul prezentei cereri de brevet de inventie in experimentele derulate s-a obtinut enzima arilsulfataza extracelulara din microbiota unui sol de pasune. Comparativ cu alte metode aceasta metoda este mai:

- ✓ *Simpla*: obtinerea arilsulfatazei extracelulare diminueaza complexitatea etapei de separare enzimatica si purificare (exclue procesele de precipitare, implicate in procesul de obtinere a arilsulfatazei intracelulare)
- ✓ *leftina*: utilizarea de microorganisme naturale reduce costurile implicate in obtinerea microorganismelor modificate genetic implicate in procesul de obtinere a arilsulfatazei intracelulare
- ✓ *Scurta, ca durata de lucru*: utilizarea unui mix de microorganisme reduce semnificativ durata procesului de obtinere a arilsulfatazei extracelulare prin eliminarea etapei de identificare si izolare a celor mai optime microorganisme necesare.

Referinte bibliografice:

1. Chen X., Li C., Liu H. Enhanced recombinant protein production under special environmental stress. *Frontiers in Microbiology*, 2021, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630814>.
2. Wang S., Zhou K., Mori T., Mo J., Zhang W. Effects of phosphorous and nitrogen fertilization on soil arylsulfatase activity and sulfur availability of two tropical plantations in southern China. *Forest Ecology and Management*, 453, 117613, 2019.
3. Patel K.A., Singhanian R.R., Paandey A. Production, purification, and application of microbial enzymes. Chapter 2 In *Biotechnology of Microbial Enzymes – Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, Ed. Brahmachari G., p. 13-41, 2017.
4. Wang X., Duan D., Fu X. Enzymatic desulfation of the red seaweeds agar by *Marinomonas arylsulfatase*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 93(PartA):600-608, 2016
5. Correia M.S.P., Ballet C., Meistermann H., Conway L.P., Globisch D. Comprehensive kinetic and substrate specificity analysis of an arylsulfatase from *Helix pomatia* using mass spectrometry. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 27(6):955-962, 2019.
6. Zhu Y., Liang H., Li H., Ni H., Li L., Li Q., Jiang Z. A mutant of *Pseudoalteromonas carrageenovora* arylsulfatase with enhanced enzyme activity and its potential application in improvement of the agar quality. *Food Chemistry*, 320, 126652, 2020.
7. Zhu Y., Qiao C., Li H., Li L., Xiao A., Ni H., Jiang Z. Improvement thermostability of *Pseudomonas carrageenovora* arylsulfatase by rational design. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 953-959, 2018.
8. Cergut M., Piutti S., Slezacek-Deschaumes S., Benizri E. Compartmentalization and regulation of arylsulfatase activities in *Streptomyces* sp., *Microbacterium* sp. and *Rhodococcus* sp. Soil isolates in response to inorganic sulfate limitation. *Microbiological Research*, 168(1):12-31, 2013.
9. Zhu Y., Liu H., Qiao C., Li L., Jiang Z., Xiao A., Ni H. Characterization of an arylsulfatase from a mutant library of *Pseudoalteromonas carrageenovora* arylsulfatase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96:370-376, 2017.
10. Kovacs Z., Jung I., Gurzau S. Arylsulfatases A and B: from normal tissues to malignant tumors. *Pathology – Research and Practices*, 215(9), 152516, 2019.
11. Kovacs Z., Jung I., Szalman K., Baniyas L., Bara Jr. T., Gurzau S. Interaction of arylsulfatases A and B with maspin: A possible explanation for dysregulation of tumor cell metabolism and invasive potential of colorectal cancer. *World Journal of Clinical Cases*, 7(23):3990-4003, 2019.

12. Filimon M.N., Roman D.L., Caraba I.V., Isvoran A. Assessment of the effect of application of the herbicides S-metolachlor on the activity of some enzymes found in soil. *Agriculture*, 11(6), 469, 2021.

REVENDICARE

Metoda de obtinere a arilsulfatazei din microbiota solului **caracterizata prin aceea ca** imbunatateste procesul de obtinere a arilsulfatazei folosind un mix de microorganisme izolate din sol cu un mediu lichid care contine $8.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 , $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl , $0.1\text{...}1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl , $0.1\text{...}1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.01\text{...}0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 , $0.01\text{...}0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 , $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KI , $0.5\text{...}3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ apoi fermentate intr-un mediu care contine 3 % NaCl , 0.3 % $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 % KCl , 0.02 % CaCl_2 , 0.01 % $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.002 % $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.01\text{...}0.1 \text{ MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.01\text{...}0.1 \text{ \% Na}_4\text{P}_2\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0.25 agar, 0.2 % drojdie, 0.5 % peptona si purificate cu coloane seriale dietilaminoetil sepharosa – schimb anionic in finalul procesului obtinandu-se arilsulfataza extracelulara purificata care analizata cu un substrat fluorescent conjugat cu colorant 4-metilumbeliferona (MUB) la o excitare/emisie in jurul valorii de 360/460 nm prezinta valori care variaza in domeniul $4.8 - 31 \text{ mU}\cdot\text{mL}^{-1}$.