



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00668

(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 PRODUCERE A ENZIMEI EXTRACELULARE
FOSFATAZĂ DIN RIZOBIOTA SOLANUM LYCOPERSICUM

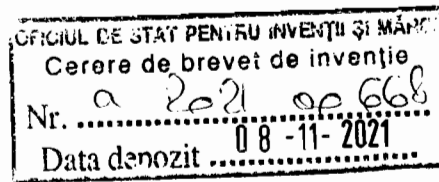
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a enzimei extracelulare fosfataza din rizobiota *Solanum Lycopersicum* destinată creșterii ratei de producere a fosfatazei alcaline extracelulare. Metoda, conform invenției, constă în etapele: extracție și izolare a mixului de microorganisme (rizobiota) dintr-o masă de sol rizosferic al *Solanum Lycopersicum*, diluare în serie cu soluție PBS modificată, realizarea unui inocul pe mediu solid cu incubare la 37°C timp de 1...5 zile, colectarea

coloniilor eficiente care prezintă solubilizarea fosfatului și creșterea coloniilor în mediu artificial cu multiplicare secvențială, rezultând enzima fosfatază alcalină extracelulară purificată având o activitate enzimatică în domeniul 28...61 mU x mL⁻¹, fiind mai mare cu 23% față de activitatea determinată din monocolonii.

Revendicări: 1





METODA DE PRODUCERE A ENZIMEI EXTRACELULARE FOSFATAZA DIN RIZOBIOTA *Solanum Lycopersicum*

DESCRIERE

Inventia se refera la o metoda de producere a enzimei extracelulare fosfataza din rizobiota *Solanum Lycopersicum* destinata cresterii ratei de producere a fosfatazei alcaline extracelulare.

După azot (N), fosforul (P) este al doilea cel mai important nutrient mineral necesar pentru cresterea plantelor. Desi fosfatul total este abundent in multe soluri, acesta este in mare parte indisponibil pentru absorbtie de catre radacinile plantelor, deoarece aproximativ 20 – 80 % din P din sol apare in forme organice. Fosforul din sol formeaza cu usurinta complexe insolubile cu cationi si/sau incorporate in materia organica de catre microorganisme. Chiar si atunci cand fosforul este aplicat ca ingrasamant, mai mult de 80 % devine indisponibil pentru absorbtie de catre plante din cauza proceselor de adsorbție, precipitare sau imobilizare microbiana [1]. Astfel, randamentul culturilor pe 30 – 40% din terenul arabil din lume este limitat de disponibilitatea fosforului. In solurile cu continut scazut de fosfor, atat plantele, cat si microorganismele au dezvoltat diverse strategii pentru cresterea aprovizionarii cu acest nutrient mineral [2]. Aceste strategii includ acidificarea rizosferei, exudarea acizilor organici si secretia de fosfataze extracelulare [3].

Fosfatazele acide sunt enzime de origine vegetala, in timp ce fosfatazele alcaline sunt secretate de bacterii, fungi si nevertebrate si functioneaza catalitic la valori ale pH-ului peste 7 [4]. Aceste enzime catalizeaza scindarea fosforului din esterii fosfatici organici in solurile acide si alcaline cu continut scazut de fosfor, facand astfel fosforul mai disponibil in aceste soluri. Fosforul organic din materia organica din sol este, prin urmare, principalul substrat pentru furnizarea de fosfor de catre fosfataze in ecosistemele naturale si agricole.

Alcalin fosfataza (EC. 3.1.3.1.) este o metaloenzima nespecifica care hidrolizeaza diverse tipuri de esterii fosforici la un pH alcalin in prezenta ionilor de zinc si magneziu. In

microorganisme, fosfataza alcalina este localizata in spatiul periplasmatic, extern membranei celulare. Acesta este eliberat in timpul inantiei de fosfat si in prezenta fosfatului in mediu. Fosfataza alcalina microbiana este semnificativ rezistenta la inactivare, denaturare si are o rata de activitate mai mare. Literatura de specialitate arata ca anumite microorganisme izolate din sol prezinta o potentiala activitate in solubilizarea si reciclarea fosfatului. Numeroase fungii si bacterii sunt capabile sa solubilizeze fosforul si multe dintre ele au un rol esential in mineralizarea si mobilizarea acestuia in plante prin crestrea biodisponibilitatii fosforului anorganic in sol. Prin urmare, utilizarea unui inocul microbial este o strategie promitatoare pentru a rezolva problemele agricole si de mediu [5].

Recent, o atentie speciala este acordata microorganismelor, adesea fiind considerate ca viitoare produse economice datorita susceptibilitatii lor la imbunatatire genetica [6, 7, 8]. Mai nou, enzimele microbiene incep sa inlocuiasca pe cele de origine vegetala sau animala in mai multe industrii (alimentara, farmaceutica, etc.) [5]. Acest lucru se datoreaza eficacitatii lor in optimizarea a diferite etape tehnologice de productie, contributia la cresterea randamentului de productie, dezvoltarea tehnologiei ADN recombinante, etc [7, 8].

In strainatate modul de obtinere a enzimelor fosfatazei are la baza doua tehnologii: fermentatia submersa si fermentatia in stare solida. In ambele cazuri se utilizeaza ca inocul microorganisme pure izolate dintr-un anumit mediu sau microorganisme modificate genetic. Pentru comercializare sunt necesare fosfataze pure, prin urmare, microorganismele trebuie sa fie crescute in conditii aseptice, fara posibile surse de contaminare (chimice, alte microorganisme, etc.). Este necesar sa se previna contaminarea cu alte bacterii deoarece ingreuneaza fluxul tehnologic: pot exista competitii pentru nutrienti; fosfatazele nu pot fi produse la fel de usor; produsul final – enzimele fosfatazei pot fi contaminate si nesigure din punct de vedere al calitatii si eficientei. De asemenea, fosfataza produsa, obtinuta in final trebuie izolata din celulele microbiene. In prezent, pe baza tehnologiilor existente din inocul de microorganisme pure sau modificate genetic se obtin fie fosfataze extracelulare, fie fosfataze intracelulare. Principalele dezavantaje ale acestor tehnologii sunt [9, 10]:

- costurile implicate si timpul alocat obtinerii microorganismelor modificate genetic: sunt necesare echipamente de inalta performanta si care au un cost ridicat, conditii speciale foarte bine controlate (clima, aseptice, etc.) si personal inalt calificat;
- izolarea microorganismelor pentru monoculturi este adesea dificila;
- obtinerea fosfatazei dorite implica: separarea celulelor (pentru a facilita eliberarea enzimelor), separarea fosfatazei de resturile celulare si celelalte enzime coextrase – procese adesea dificile, costisitoare si mari consumatoare de timp.

In tara, sunt putine studii care se adreseaza obtinerii enzimelor, in general, din microorganisme. Majoritatea lucrarilor publicate sunt adresate identificarii potentialelor surse de enzime [11], studiului comportamentului enzimelor [12] si potentialul aplicarii enzimelor in diferite domenii [13].

Scopul prezentei inventii este de a elabora o metoda noua, originala de crestere a ratei de productie a fosfatazei alcaline extracelulare de catre rizobiota *Solanum lycopersicum*. Prezenta metoda propune obtinerea fosfatazei alcaline extracelulare generate de rizobiota *Solanum lycopersicum* dintr-o cultura mixta de microorganisme. Prezenta cerere de brevet prezinta conditiile de crestere a mixului de microorganisme extrase din rizosfera *Solanum lycopersicum*, conditiile de obtinere a fosfatazei alcaline extracelulare si modul de purificare a fosfatazei alcaline extracelulare.

Problemele tehnice pe care le rezolva inventia sunt:

- eliminarea etapei de identificare si izolare a microorganismelor specifice care pot genera fosfataza alcalina, etapa costisitoare si consumatoare de timp, care conform metodei propuse prin prezenta cerere de brevet se realizeaza prin utilizarea unui mix de microorganisme;
- simplificarea si reducerea complexitatii fluxului tehnologic de obtinere a fosfatazei alcaline extracelulare comparativ cu tehnicile de obtinere a fosfatazei alcaline intracelulare.

Originalitate si noutate:

- reduce timpul si elimina dificultatea etapelor de identificare, izolare si crestere a microorganismelor generatoare de fosfataza alcalina;

- elimina problemele aparute in procesul de separare a celulelor pentru facilitarea eliberarii enzimei;
- reduce dificultatea etapei de separare a enzimei de resturile celulare;
- creste stabilitatea enzimei in afara conditiilor celulare
- reduce semnificativ costurile de purificare.

Modul de lucru pentru aplicarea metodei optimizate de productie a enzimei extracelulare fosfataza din rizobiota *Solanum Lycopersicum*. Prezenta cerere de brevet propune obtinerea fosfatazei alcaline extracelulare generate de rizobiota *Solanum lycopersicum* dintr-o cultura mixta de microorganisme. Etapele procesului de obtinere a fosfatazei alcaline sunt:

1. izolarea si cresterea rizobioti extrase din rizosfera *Solanum lycopersicum*;
2. obtinerea fosfatazei alcaline extracelulare.

Etapa de izolare si crestere a mixului de microorganisme (rizobiota) extrase din rizosfera *Solanum lycopersicum*: aceasta etapa implica extractia rizobioti din rizosfera *Solanum lycopersicum* si cresterea rizobioti extrase in mediu artificial, dupa cum urmeaza:

- Dintr-o masa m de sol rizosferic al *Solanum lycopersicum* se extrage rizobiota cu o solutie PBS modificata (1 L solutie PBS contine: 8 g NaCl, 200 mg KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 245 mg KH₂PO₄, 50...200 mg d-glucoza, 2...5 mg piruvat de sodiu, 100...500 mg albumina serica bovina).
- Mixul de rizobiota astfel extras se dilueaza in serie (10⁷) cu solutie PBS modificata.
- Din solutia diluata a rizobioti se realizeaza un inocul pe mediu solid NA si se incubeaza la 37 °C pentru un interval de timp de 1...5 zile. Restul de extract al rizobioti se pastreaza in mediu lichid.
- Se realizeaza testul activitatii fosfatazei alcaline pe mediu solid de agar cu extract de sol la care s-a adaugat o masa m de CaCl₂ si KH₂PO₄ sterilizat. Incubarea are loc pe o durata de 12...48 h, intre 35...37 °C.
- In continuare, se colecteaza doar acele colonii care prezinta solubilizarea fosfatului in jurul lor.

- Aceste colonii se cresc in continuare in placi cu agar luria si se multiplica secvential pe toata durata producerii fosfatazei alcaline extracelulare.

Etapa de obtinere al fosfatazei alcaline extracelulare din rizobiota extrasa din rizosfera *Solanum lycopersicum* a avut loc conform urmatoarilor pasi:

- O masa m de 1...5 % din coloniile de microorganisme a fost transferata pe un mediu Bunt and Rovira modificat. Acest mediu modificat contine: 10 g $C_6H_{12}O_6$, 1...5 g cazeina, 1 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.2 g KCl, 0.1...1 g K_2HPO_4 , 0.2 g $MgSO_4$, 15 g agar, 0.1 % Zn .
- pH-ul mediului a fost cuprins intre 6.5.. 8.
- Acest mediu a fost incubat la o temperatura cuprinsa intre 30...35 °C pentru o durata de timp de 24...48 ore.
- Dupa incubare si formarea enzimei fosfaza alcalina extracelulara, aceasta enzima obtinuta a fost purificata prin tehnica precipitarii sulfatului de amoniu
- Precipitatul obtinut a fost centrifugat timp de 10...30 min la 3500 rpm
- Se adauga un volum v de 30...70 % $(NH_4)_2SO_4$ raportat la volumul de proba
- Se echilibreaza la rece la temperatura 4...6 °C, timp de 8 h.
- Dupa incubare, supernatantul se elimina, obtinandu-se astfel enzima pura: fosfataza alcalina extracelulara.

Activitatea enzimei purificate – fosfataza alcalina 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. Rezultatele obtinute au fost in domeniul 27 – 61 mU·mL⁻¹. Activitatea enzimatica purificata obtinuta de la coloniile eficiente in solubilizarea fosfatului a variat in domeniul 28 – 61 mU·mL⁻¹, acesta fiind mai mare aproximativ cu 23 % fata de activitatea determinata din monocolonii.

Avantajele metodei:

Prin aceasta metoda s-a obtinut enzima fosfataza alcalina extracelulara din rizobiota rizosferei *Solanum lycopersicum*. Comparativ cu alte metode aceasta metoda este mai:

- *Usuara*: fosfataza alcalina extracelulara este obtinuta mult mai usor comparativ cu fosfataza alcalina intracelulara; utilizarea unui mix de microorganisme cu

- potential ridicat de solubilizare a fosfatului exclude dificultatea ridicata de izolarea microorganismelor pentru monoculturi care adesea este foarte dificila;
- *Stabila*: activitatea fosfatazei alcaline extracelulare astfel obtinuta a prezentat o stabilitate mai ridicata in timp: 48 h la 30 °C.
 - *Eficienta*: prin folosirea coloniilor eficiente in solubilizarea fosfatului, randamentul de productie a fosfatazei alcaline extracelulare a crescut cu aproximativ 23 %
 - *Avantajoasa din punct de vedere al costului si duratei*: sunt eliminate costurile implicate si timpul alocat obtinerii microorganismelor modificate genetic.

Referinte bibliografice:

1. Li J., Xie T., Zhu H., Zhou J., Li C., Xiong W., Xu L., Wu Y., He Z., Li X. Alkaline phosphatase activity mediates soil organic phosphorus mineralization in a subalpine forest ecosystem. *Geoderma*, 404, 115376, 2021.
2. Chen X., Condrón L.M., Dunfield K.E., Wakelin S.A., Chen L. Impact of grassland afforestation with contrasting tree species on soil phosphorus fractions and alkaline phosphatase gene communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 159, 108274, 2021.
3. Zheng M.M., Wang C., Li X.W., Guo L., Cai Z.J., Wang B.R., Chen J., Shen R.F. Changes of acid and alkaline phosphatase activities in long-term chemical fertilization are driven by the similar soil properties and associated microbial community composition in acidic soil. *European Journal of Soil Biology*, 104, 103312, 2021.
4. Vaidya B.P., Hagmann D.F., Balacco J., Passchier S., Krumins J.A., Goodey N.M. Plants mitigate restrictions to phosphatase activity in metal contaminated soils. *Environmental Pollution*, 265(Part A), 114801, 2020.
5. Sharifian S., Homaei A., Kin S.K., Satarui M. Production of newfound alkaline phosphatases from marine organisms with potential functions and industrial applications. *Process Biochemistry*, 64:103-115, 2018.
6. Lu Z., Chen W., Liu R., Hu X., Ding Y. A novel method for high-level production of psychrophilic TAB5 alkaline phosphatase. *Protein Expression and Purification*, 74(2):217-222, 2010.
7. Yousef M.S., El-Gendi H., Ghozlan H., Sabry S.A., Soliman N.A., Abdel-Fattah Y.R. Production, partial purification and characterization of alkaline phosphatase from a thermo-alkaliphile *Geobacillus thermodenitrificans* I2 isolate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 31, 101853, 2021.
8. Pandey S.K., Banik R.M. Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. *Bioresources Technology*, 102(5):4226-4231, 2011.
9. Banik R.M., Pandey S.K. Selection of metal salts for alkaline phosphatase production using response surface methodology. *Food Research International*, 42(4), 470-475, 2009.
10. Jazini M., Herwig C. Effect of post-induction substrate oscillation on recombinant alkaline phosphatase production expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(6):606-610, 2011.
11. Ruginescu R., Gomoiu I., Popescu O., Cojoc R., Neagu S., Lucaci I., Batinescu-Moteau C., Enache M. Bioprospecting the novel halophilic and halotolerant sources of hydrolytic enzymes in brackish, saline and hypersaline lakes of Romania. *Microorganisms*, 8(12), 1903, 2020.

12. Selisteanu D., Tebbani S., Roman M., Petre E., Georgeanu V., Microbial production of enzymes: nonlinear state and kinetic reaction rates estimation. *Biochemical Engineering Journal*, 91:23-36, 2014.
13. Bucur B., Munteanu F.D., Marty J.L., Vasilescu A. Advances in enzyme-based biosensors for pesticide detection. *Biosensors*, 8(2), 27, 2018.

REVEDICARE

Metoda de producere a enzimei extracelulare fosfataza din rizobiota *Solanum Lycopersicum*, simpla si eficienta **caracterizata prin aceea ca** dintr-o masa m de sol rizosferic al *Solanum lycopersicum* se extrage rizobiota cu o solutie PBS modificata (1 L solutie PBS contine: 8 g NaCl, 200 mg KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 245 mg KH₂PO₄, 50...200 mg d-glucoza, 2...5 mg piruvat de sodiu, 100...500 mg albumina serica bovina) apoi mixul de rizobiota astfel extras se dilueaza in serie (10⁷) cu solutie PBS modificata iar din solutia diluata a rizobiotei se realizeaza un inocul pe mediu solid NA care se incubeaza la 37 °C pentru 1...5 zile pe care apoi se realizeaza testul activitatii fosfatazei alcaline pe mediu solid de agar cu extract de sol la care se adauga o masa m de CaCl₂ si KH₂PO₄ sterilizat, incubarea avand loc pentru 12...48 h, la 35...37 °C dupa care se colecteaza doar acele colonii care prezinta solubilizarea fosfatului in jurul lor si din care o masa m de 1...5 % din coloniile de microorganisme este transferata pe un mediu Bunt and Rovira modificat care contine: 10 g C₆H₁₂O₆, 1...5 g cazeina, 1 g (NH₄)₂SO₄, 0.2 g KCl, 0.1...1 g K₂HPO₄, 0.2 g MgSO₄, 15 g agar, 0.1 % Zn, cu un pH intre 6.5.. 8, mediu incubat la o temperatura cuprinsa intre 30...35 °C pentru o durata de timp de 24...48 ore, dupa incubare si formarea enzimei fosfaza alcalina extracelulara, aceasta enzima obtinuta se purifica prin tehnica precipitarii sulfatului de amoniu, dovedindu-se experimental ca prin folosirea coloniilor eficiente in solubilizarea fosfatului, randamentul de producere a fosfatazei alcaline extracelulare a crescut cu aproximativ 23 %.