

Aldehid-dehidrogenază nouă dintr-o bacterie antarctică folosită ca și catalizator foarte eficient pentru biotehnologii și biosenzori la temperaturi scăzute

RAPORT STIINTIFIC SINTETIC

2017-2018

Web site: <http://www.ibiol.ro/proiecte/PNII/COLDESENSOR/index.htm>

Proiectul COLDESENSOR a urmarit obținerea aldehid dehidrogenazei (ALDH) dintr-o bacterie psihrofilă izolată din Antarctica reprezentând un biocatalizator performant pentru procese biotehnologice la temperaturi scăzute și în biosensing.

Obiectivele proiectului au cuprins (1) Obținerea și caracterizarea ALDH recombinante din *Flavobacterium* PL02 (F-ALDH), imobilizarea pe nanoparticule de magnetita și dezvoltarea unor biosenzori de unică folosință și reutilizabili și (2) Optimizarea și validarea biosenzorilor bazati pe F-ALDH și caracterizarea enzimei imobilizate pe nanoparticule de magnetita pentru aplicații biotehnologice.

Rezultatele obținute în cadrul proiectului au fost **realizate conform planului de lucru**, dezvoltând toate etapele prevăzute, în urma cărora s-a obținut o aldehid dehidrogenaza recombinantă dintr-o bacterie psihrofila care prezintă stabilitate ridicată într-un interval larg de temperaturi și specificitate de substrat pentru o serie de aldehide aromatice și alifatică, în prezența cofactorilor NAD(P)⁺. În urma imobilizării, enzima prezintă proprietăți funcționale corespunzătoare utilizării în biotehnologii și a fost utilizată pentru obținerea de biosenzori pentru determinarea benzaldehidei. Metoda bazată pe un biosenzor reutilizabil a fost validată în condiții de laborator pentru determinarea benzaldehidei din alcoolul benzilic, folosit în produsele farmaceutice ca agent antimicrobian. Astfel, nivelul de maturitate tehnologică atins la finalul proiectului este TRL4. Un alt rezultat notabil al proiectului constă în observația că aldehid dehidrogenaza este inhibată de tiuram, un fungicid din clasa ditiocarbamatilor și acest principiu stă la baza realizării unui biosenzor de unică folosință pentru determinarea tiuramului, cu

aplicatii potientiale in controlul calitatii apelor. Metoda bazata pe biosenzor pentru determinarea tiuramului face face obiectul unei aplicatii de brevet.

Ansamblul etapelor realizate consta in:

OBTINEREA F-ALDH RECOMBINANTE

- Identificarea genei *aldh3* din tulpina bacteriana marina psrihrofila *Flavobacterium* PL02 izolata din Antarctica care codifica pentru aldehyd dehidrogenaza
- Clonarea genei *aldh3* prin amplificare PCR și ligare in vectorul de expresie bacterian pHAT2, rezultand plasmidul pF-ALDH
- Expresia proteinei recombinante F-ALDH in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Optimizarea conditiilor de expresie a enzimei solubile: incubare 16 h la 25°C in mediul Luria Bertani in prezenta 0.5 mM IPTG.
- Purificarea enzimei recombinante intr-o etapa prin cromatografie de afinitate utilizand rasina Ni-NTA. Enzima solubila a fost eluata in prezenta a 100 mM imidazol si pastrata in 50 mM tampon fosfat, pH 7 aditivat cu 10 mM β-mercaptoetanol la 4°C in stocuri avand concentratii de 0.5-2 mg/ml.

CARACTERIZAREA ENZIMATICA A F-ALDH LIBERE

- F-ALDH utilizeaza o paleta larga de substrat alifatic si aromatic, activitatea optima fiind obtinuta in prezenta tamponului glicina-KOH, pH = 9.5, 10 mM β-mercaptoetanol.
- F-ALDH utilizeaza ambii cofactori NAD(P)⁺ pentru oxidarea selectiva a aldehydelor alifatic si aromatic
- Activitatea enzimatica este favorizata de tamponul glicina-KOH
- pH-ul optim de reactie este 9.5 in prezenta substratului 4-izopropilbenzaldehyda
- Activitatea solutiei enzimatice nu este afectata prea mult de prezenta 1 mM CaCl₂, NiCl₂, MgCl₂, Mg SO₄, 2% Triton X-100 sau 2 mM EDTA.
- F-ALDH este stabila la temperaturi de pana la 60°C
- Stabilitatea enzimei la 4°C in 50 mM tampon fosfat, pH 7 aditivat cu 10 mM β-mercaptoetanol, indica posibilitatea pastrarii in aceste conditii pana la 18 zile cu

pierderea a 20-25% din activitate incepand cu ziua a 8-a utilizand cofactorul NAD^+ , iar in cazul utilizarii cofactorului NADP^+ activitatea scade cu 35% dupa ziua a 8-a.

- Activitatea enzimatica creste exponential cu temperatura de reactie, corespunzatoare unei energii de activare $E_a = 13.46 \text{ kJ/mol}$ ($20-60^\circ\text{C}$) si $E_a = 49.8 \text{ kJ/mol}$ ($0-20^\circ\text{C}$) cu NAD^+ utilizat ca si cofactor.
- Parametrii cinetici masurati la 25°C in prezenta substratului benzaldehida variaza in functie de tipul de cofactor (NAD^+ : $k_{\text{cat}} = 27.83 \text{ s}^{-1}$; $K_M = 0.1459 \text{ mM}$) (NADP^+ : $k_{\text{cat}} = 7.07 \text{ s}^{-1}$; $K_M = 0.03926 \text{ mM}$)
- Eficienta catalitica este asemanatoare in cazul utilizarii ambilor cofactori: $190.74 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (NAD^+) si $180.08 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (NADP^+)

CARACTERIZAREA ENZIMATICA A F-ALDH IMOBILIZATE

- F-ALDH purificata a fost imobilizata pe rasina superparamagnetica Dynabeads la 4°C timp de 1h în tampon fosfat 50 mM, pH = 7, continand 10 mM βME , cu un randament de de 36%
- In urma conservarii la 4°C timp de 11 zile s-a observat o reducere a activitatii enzimaticice a F-ALDH imobilizate pe Dynabeads de 35%

DEZVOLTAREA UNUI SENZOR SENSIBIL DE NADH

- Prin investigarea mai multor tipuri de electrozi modificati cu nanomateriale si mediatori electrochimici a fost dezvoltat un senzor de NADH care prezinta o sensibilitate $80.0 \pm 2.5 \mu\text{A cm}^{-2} \cdot \text{mmol}^{-1}\text{L}$ si o limita de detectie de $0.5 \mu\text{M}$
- Senzorul consta intr-un electrod serigrafiat de carbon modificat cu nanofibre de C, disponibil comercial pe suprafata caruia a fost depus un amestec format din mediatorul Meldola Blue si oxid de grafena. Oxidul de grafena a fost apoi redus electrochimic. Sensorii obtinuti astfel prezinta o sensibilitate (exprimata ca panta curbei de calibrare) de aproximativ 10 ori mai ridicata decat senzori similari fara nanofibre de carbon si un domeniu liniar extins de 3-300 μM .

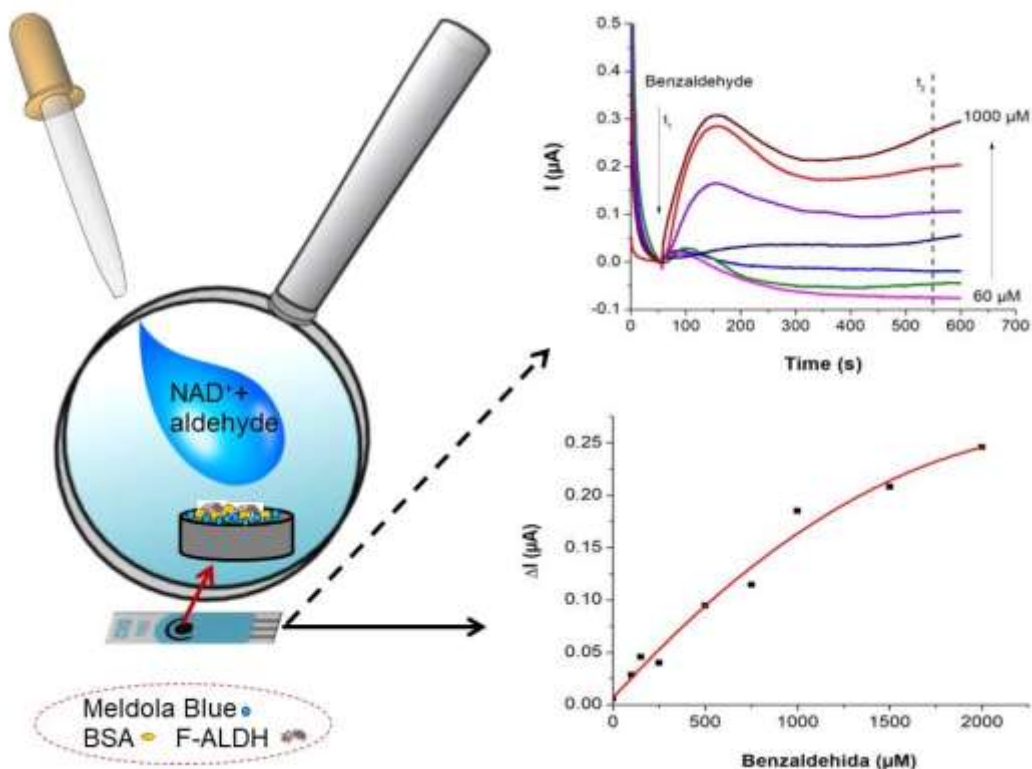
- Utilizarea oxidului de grafena nu imbunatateste semnificativ stabilitatea operationala a senzorilor de NADH
- Problema stabilitatii operationale a fost rezolvata prin obtinerea unui complex insolubil de Meldola Blue, care a fost depus pe electrozi de carbon modificati cu nanofibre de carbon. Senzorul rezultat a fost integrat intr-un sistem de analiza in flux FIA, si a fost caracterizat printr-o limita de detectie de 0.5 μM NADH si un domeniu liniar de pana la 400 μM .

DEZVOLTAREA DE BIOSENZORI PENTRU APLICATII INDUSTRIALE

In cadrul acestui proiect au fost identificate doua potentiale aplicatii industriale ale biosenzorilor bazati pe F-ALDH si anume : (1) determinarea benzaldehidei din alcool benzilic folosit ca agent antimicrobian in produsele farmaceutice neinjectabile si (2) determinarea fungicidelor ditiocarbamate din ape

DEZVOLTAREA UNUI BIOSENZOR REUTILIZABIL

Dintre metodele de imobilizare testate, rezultate optime au fost obtinute prin imobilizarea covalenta a F-ALDH, cu BSA si glutaraldehyda pe suprafata electrozilor serigrafati de carbon modificati cu mediatorul Meldola Blue. Cofactorul enzimatic NAD^+ nu a putut fi imobilizat si trebuie adaugat in mediul de reactie la fiecare determinare. Biosenzorul reutilizabil obtinut a fost testat folosind ca substrat enzimatic benzaldehida. Drept metoda de detectie s-a folosit cronoamperometria, iar analiza s-a facut in volume mici de proba (50 μL), cu electrozii fixati orizontal pe suport, dupa cum este ilustrat in figura de mai jos.



- Conform protocolului de masura, pe suprafata electrozilor se depune initial un volum de 50 μL solutie tampon pH 10 continand 1.6 mM NAD^+ (cofactorul enzimatic) si se aplica o diferenta de potential de 0.1 V. Dupa $t_1 = 60$ s se adauga un volum de 10 μL proba sau standard de benzaldehida si se inregistreaza intensitatea curentului electric generat in celula electrochimica la t_2 , de exemplu 600 s. Principiul biosenzorului se bazeaza pe proportionalitatea dintre concentratia de benzaldehida din proba si diferenta intre intensitatea curentului electric la cele 2 momente de timp, t_2 si t_1 .
- Biosenzorul a fost caracterizat in ce priveste limita de detectie (17 μM benzaldehida), domeniul liniar (80-800 μM), sensibilitatea, precizia, specificitatea si stabilitatea. In plus a fost determinata acuratatea metodei prin analiza unor probe de alcool benzilic in care s-au adaugat intentionat cantitati de benzaldehida de 0.095-0.5%. Probele au fost analizate in paralel prin HPLC.

- Biosenzorul este stabil cel puțin 11 zile la 4° C, pastrat în absența umidității.
- Datele obținute conduc la concluzia că metoda bazată pe biosenzor este adecvată determinării benzaldehidei din alcool benzilic folosit în industria farmaceutică ca agent antimicrobian în produse farmaceutice neinjectabile. Pentru acest tip de produse, Farmacopeea Europeană prevede un conținut maxim admisibil de 0.15% benzaldehidă în alcoolul benzilic.

DEZVOLTAREA UNUI BIOSENZOR DE UNICA FOLOSINTĂ

A fost evaluată influența câtorva potențiali inhibitori activității enzimatice a F-ALDH precum săruri ale metalelor grele (NiCl_2 , CuSO_4) și fungicide din clasa ditiocarbamatilor (maneb, ziram, propineb, tiuram). Dintre compușii testați, tiuramul a prezentat un efect inhibitor semnificativ asupra F-ALDH. Detectia tiuramului cu un biosenzor de unică folosință bazat pe F-ALDH face obiectul unei aplicații de brevet în pregătire.

NIVELUL DE MATURITATE TEHNOLOGICĂ LA FINALIZAREA PROIECTULUI

În urma validării în condiții de laborator a biosenzorilor reutilizabili bazati pe F-ALDH pentru determinarea benzaldehidei din alcool benzilic, la finalul proiectului, legat de acest biosenzor a fost atins nivelul de maturitate tehnologică 4 (**TRL 4**).

MODUL DE ATRIBUIRE ȘI EXPLOATARE A REZULTATELOR ÎNTRE PARTENERI

Modul de atribuire și exploatare a rezultatelor între parteneri a fost stabilit la începutul proiectului prin Acordul ferm de colaborare. Ținând cont de contribuția ambilor parteneri la realizarea biosenzorilor bazati pe F-ALDH, membrii echipelor celor 2 parteneri implicați în această activitate sunt coautori la aplicația de brevet și la articolele referitoare la biosenzori.

PROIECTUL A GENERAT

- enzima aldehyd dehidrogenaza recombinantă din bacteria *Flavobacterium* PL2 și caracterizarea stabilității și proprietăților sale funcționale

- enzima imobilizata pe microparticule magnetice si pe rasina Ni-NTA-agaroză si caracterizarea proprietatilor sale
- senzor sensibil de NADH obtinut prin modificarea electrozilor cu nanofibre de carbon cu Meldola Blue si oxid de grafena
- complex de Meldola Blue cu solubilitate scazuta, cu proprietati de mediator electrochimic la oxidarea NADH si senzor de NADH stabil, integrabil in sisteme FIA obtinut prin modificarea electrozilor cu acest complex.
- biosenzor reutilizabil obtinut prin imobilizarea covalenta a F-ALDH pe suprafata senzorilor de NADH si metoda validata pentru analiza benzaldehidei din alcool benzilic
- metoda de detectie a fungicidului tiuram si aplicatie de brevet in pregatire pe principiul inhibarii activitatii F-ALDH
- 10 participari la conferinte internationale
- 1 capitol de carte
- 3 articole ISI in evaluare, 1 articol ISI in curs de redactare
- 1 workshop organizat in cadrul proiectului

Rezultate preconizate	Rezultate obtinute
Obtinerea si caracterizarea F-ALDH din <i>Flavobacterium</i> PL02	Raport asupra clonarii, expresiei, purificării si caracteristicilor enzimaticice ale F-ALDH
Raport asupra caracteristicilor enzimaticice ale F-ALDH imobilizate pe rășina magnetică	Raport asupra caracteristicilor enzimaticice ale F-ALDH imobilizate pe nanoparticule de magnetita
Publicatie referitoare la obtinerea si caracterizarea F-ALDH	<ul style="list-style-type: none"> • Publicatie referitoare la obtinerea si caracterizarea F-ALDH in evaluare (<i>Microbial Cell Factories</i>; IF = 3.681) • Articol „Biosensor for aldehydes detection based on a novel enzyme from a psychrophilic bacterium” in curs de redactare (<i>Microchimica Acta</i>, IF = 4.6) • Articol referitor la cuplarea F-ALDH cu un senzor electrochimic de NADH pentru detectia benzaldehidei, in evaluare (<i>Electroanalysis</i>, IF = 2.471) • Capitol de carte (Elsevier) – in press
Specificatii finale, manual de utilizare si raport de validare al biosenzorilor pentru aplicatii industriale	Specificatii finale, manual de utilizare si raport de validare al biosenzorilor pentru determinarea benzaldehidei din alcoolul benzilic destinat produselor farmaceutice neinjectabile.
Aplicatie de patent asupra biosenzorilor F-ALDH	Aplicatie de brevet in pregatire
Web site al proiectului, participare la conferinte	Web site al proiectului adus la zi Participare la conferinte internationale: 8 prezentari orale, 2 postere

DISEMINAREA REZULTATELOR

PUBLICATII

Capitol de carte

1. Purcarea C, Necula-Petrareanu G, Vasilescu A. Extremophile-assisted nanomaterial production and nanomaterial-based biosensing. In “Functional nanostructured interfaces for environmental science and biomedical applications”. Elsevier. in press

Articole

1. Titoiu AM, Lapauw M, Necula-Petrareanu G, Purcarea C, Fanjul-Bolado P, Marty J-L, Vasilescu A. Carbon nanofiber and Meldola Blue based electrochemical sensor for NADH: application to the detection of benzaldehyde. *Electroanalysis* (IF = 2.471), ***in evaluare***
2. Necula-Petrareanu G, Lavin P, Vasilescu A, Purcarea C. Novel thermostable aldehyde dehydrogenase from the Antarctic *Flavobacterium* PL02 psychrophilic strain. *Microbial Cell Factories* (IF = 3.681) ***in evaluare***
3. Vasilescu A, Titoiu AM, Visinescu D, Dinca V, Szunerits S, Necula-Petrareanu G, Purcarea C, Biosensor for aldehydes detection based on a novel enzyme from a psychrophilic bacterium, ***in curs de redactare***
4. Iancu L., G. Necula-Petrareanu, E. Junkins, C. Purcarea. Necrophagous insects and bacterial communities as decomposition indicators for postmortem interval estimation in buried remains. *eLife* (IF = 7.725) ***in evaluare***

Brevet

1. Alina Vasilescu, Ana Maria Titoiu, Georgiana Necula –Petrareanu, Cristina Purcarea. „Metoda bazata pe biosenzor pentru detectia tiuramului” - ***in curs de redactare***

CONFERINTE (10 prezentari – 8 prezentari orale si 2 postere)

- 1. Aplicatii moderne ale enzimelor in biosensing si biotehnologie.** Bucuresti, Romania, 6 septembrie 2017
 - *Isolation of cold-active enzymes for applications in biosensing and biotechnology.* Georgiana Necula-Petrareanu, P. Lavin, A. Vasilescu, C. Purcarea - **prezentare orală**
 - *Biosensors based on NAD⁺-dependent dehydrogenases for practical applications.* Alina Vasilescu - **prezentare orală**
- 2. New Trends on Sensing - Monitoring -Telediagnosis for Life Sciences.** Bucuresti, Romania, 7-9 septembrie 2017
 - *Aldehyde dehydrogenase from a psychrophilic bacterium for cold sensor applications.* Georgiana Necula-Petrareanu, P. Lavin, A. Vasilescu, M. Lapauw, C. Purcarea - **prezentare orală**
 - Evaluation of carbon-nanomaterial based sensors for NADH detection. Alina Vasilescu, Maxime Lapauw, Georgiana Necula-Petrareanu, Cristina Purcarea - **prezentare orală**
- 3. Euroanalysis 2017**, Stockholm, Suedia, 28 august-1 septembrie 2017
 - Mediator and carbon nanomaterial-modified screen printed electrodes for NADH sensing. Andrei Florin Danet, Alina Vasilescu – **poster**
- 4. Perspectivele bioinformaticii în Romania**, Cluj-Napoca, Romania, 24 noiembrie 2017
 - *Diversitate microbiana prin secventializare 16SrRNA Illumina si shotgun.* Lavinia Iancu, Victoria I. Paun, Corina Itcus, Antonio Mondini, Cristina Purcarea - **prezentare orală**
- 5. International Symposium on Cryosphere and Biosphere 2018**, Kyoto, Japonia, 14-19 martie 2018
 - Thermal response of pyrimidine nucleotide genes expression in the psychrophilic bacterium *Glaciibacter superste*. A.Mondini, C. Purcarea - **prezentare orală**
- 6. European Biotechnology Congress**, Atena, Grecia, 26-28 aprilie 2018
 - Antarctic Flavobacterium aldehyde dehydrogenase – a cold-adapted catalyst for biosensing. Georgiana Necula-Petrareanu, P. Lavin, A. Vasilescu, M. Lapauw, C. Purcarea - **prezentare orală**
- 7. International Conference "Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences"**, Brasov, Romania, 24 mai 2018
 - Stable NADH detection with carbon nanofibers and Meldola Blue-modified electrodes. Vasilescu A, Titoiu AM, Visinescu DB, Necula-Petrareanu G, Purcarea C - **prezentare orală**

- Molecular Adaptations to Low Temperatures of Cold-Active Microbial Catalysts. Necula-Petrareanu G, Mondini A, Lavin P, Vasilescu A, Purcarea C. - **poster**

ORGANIZARE WORKSHOP

Workshopul „Modern applications of enzymes in biosensing and biotechnology” a fost organizat de ICB in colaborare cu IBB in 6 septembrie 2017, cu participarea a peste 20 de cercetatori de la institute din Romania si de la laboratorul BAE, Universitatea din Perpignan, Franta.

STAGII DE PREGATIRE

- **18 aprilie – 24 iunie 2017:** stagiul de pregatire a student masterand Maxime Lapauw, Universitatea din Perpignan, Franta in cadrul colaborarii ICB, in laboratorul Dr. Alina Vasilescu. Studiile sale au contribuit la confirmarea rezultatelor preliminare obtinute cu electrozii modificati cu nanomateriale si Meldola Blue, a fost instruit la ICB si la IBB si a facut teste de activitate enzimatica, inhibitie enzimatica precum si masuratori electrochimice cu electrozii modificati cu F-ALDH.
- **1–30 iunie 2018:** stagiul de pregatire a studentei masterande Manon Lucasson, Universitatea din Perpignan, Franta, in laboratorul de Electrochimie Aplicata din cadrul CIB, sub indrumarea Dr. Alina Vasilescu, in cadrul colaborarii cu CIB. Studiile efectuate vizand efectul metalelor grele si al fungicidelor ditiocarbamate asupra activitatii F-ALDH au contribuit la caracterizarea enzimei din punct de vedere al inhibitiei enzimatice si au pus bazele dezvoltarii de biosenzori electrochimici pentru determinarea inhibitorilor F-ALDH. Stagiul studentei de la Perpignan continua si dupa terminarea proiectului PED, pana pe 3 august 2018. Astfel se preconizeaza exploarea la maxim a cunostintelor rezultate in proiect. In functie de rezultatele obtinute, se preconizeaza trimiterea spre publicare a unui articol referitor la un biosenzor pentru determinarea poluantilor inhibitori ai F-ALFH in ape de suprafata.

WEBSITE

- S-a realizat website-ul: <http://www.ibiol.ro/proiecte/PNIII/COLDSENSOR/index.htm>
- anuntul proiectului COLDSENSOR a fost postat pe site-ul ICB, la adresa <http://www.biodyn.ro/PROJECTS/COLDSENSOR/coldsensor.html>
- website-ul a fost adus la zi in noiembrie 2017 si iunie 2018 pentru a include cele mai recente rezultate din proiect

DEPLASARI

Pe parcursul proiectului au fost efectuate mai vizite de lucru la Institutul de Cercetare Dezvoltare pentru Viticultura si Vinificatie Valea Calugareasca si la Universitatea Aurel Vlaicu din Arad, astfel:

Vizite de lucru la ICDVV Valea Calugareasca

In data de 16 martie 2017 cercetatorii de la ICB, Alina Vasilescu si Szilveszter Gáspár, au efectuat o vizita la Institutul de Cercetare Dezvoltare pentru Viticultura si Vinificatie Valea Calugareasca, ocazie cu care a fost discutata extinderea colaborarii dintre cele doua institutii. ICDVV poate furniza probe de vin si pune la dispozitie metoda standard pentru determinarea acetaldehidei din vin. Determinarea acetaldehidei din vin reprezinta una din posibilele aplicatii industriale ale biosenzorilor bazati pe F-AIDH.

27 februarie 2018: deplasare efectuata de Alina Vasilescu de la CIB. Au fost discutate metodele de detectie a acetaldehidei din vinuri. Din discutii a reiesit faptul ca determinarea continutului in acetaldehida nu reprezinta unul din parametrii determinati in mod curent in vinuri, in ciuda importantei sale in ce priveste caracteristicile organoleptice si stabilitatea culorii vinurilor. S-a stabilit o colaborare pe aceasta tema daca va fi dezvoltat un biosenzor pentru determinarea acetaldehidei bazat pe F-AIDH.

5 martie 2018: deplasare efectuata de Alina Vasilescu de la CIB. A fost discutata o aplicatie de proiect pentru competitia Era-Net-SusCrop (intitulata „Resource optimization in vineyard by valorization of grape pomace-POMEFFECT”) care a si fost depusa pe 4 aprilie 2014. Aceste discutii au pus baza unor colaborari viitoare ale IBB si CIB nu doar cu ICDVV Valea Calugareasca dar si cu ceilalti parteneri din proiect, respectiv DropSens, Spania, Universitatea Lleida, Spania, laboratorul BAE, Universitatea din Perpignan, Franta si Akinao, Perpignan, Franta. Aplicatia de proiect a trecut in faza a doua de evaluare, cu invitatia adresata consorțiului de a depune propunerea de proiect in forma extinsa.

Vizita de lucru la Universitatea Aurel Vlaicu din Arad - Alina Vasilescu (CIB)

27-30 martie 2018: Au fost vizitate laboratoarele de analiza si imagistica de suprafata (SEM, TEM, AFM, microscopie optica), precum si de cromatografie (HPLC/MS si GC/MS) si a fost discutata o viitoare colaborare prin care biosenzorii dezvoltati in cadrul COLDSSENSOR sa fie caracterizati la Universitatea din Arad (aceste metode de analiza prin SEM si TEM foarte sensibile nefiind disponibile la CIB). S-a discutat de asemenea despre validarea rezultatelor obtinute cu biosenzorii prin analiza clasica a aldehydelor prin metoda cromatografica la UAV

Intalniri de proiect

Cercetatorii de la ICB s-au intalnit in numeroase ocazii (in medie, odata pe luna) cu colegii de la IBB pentru a discuta progresul proiectului, a decide asupra participarii comune la conferinte si a pregati organizarea seminarului din 6 septembrie 2017. IBB a produs si furnizat in mod regulat noua enzima F-ALDH cercetatorilor de la ICB pentru dezvoltarea de biosenzori.

PERSPECTIVE DE COLABORARE

CIB a organizat in colaborare cu IBB in data de 6 septembrie 2017, seminarul cu titlul „Modern applications of enzymes in biosensing and biotechnology” la care au participat peste 20 de cercetatori de la institute si universitati din Romania si de la laboratorul BAE, Universitatea din Perpignan, Franta.

In perioada 13-22 noiembrie 2017, cu ocazia deplasarii la laboratorul BAE, Universitatea din Perpignan, Franta in cadrul unui alt proiect (Brancusi, proiect de mobilitati Romania- Franta), CIB si BAE au convenit asupra stagiului studentei similar pentru un alt student de la Perpignan, care va veni in perioada aprilie-iunie 2018 si va fi instruit si va lucra pe o tema conexa proiectului COLDSENSOR, respectiv biosenzori pentru fungicide bazati pe F-ALDH. Se preconizeaza astfel pogresul mai rapid in cadrul proiectului COLDSENSOR si largirea colaborarii cu Universitatea Perpignan si IBB Bucuresti. Tot in cadrul acestei deplasari la Perpignan s-a discutat despre caracteristicile electrozilor serigrafati produsti in cadrul laboratorului BAE, Universitatea din Perpignan. BAE a pus la dispozitia CIB un set de electrozi serigrafati de carbon pentru a fi comparati cu cei disponibili comercial utilizati in prezent in cadrul proiectului. Se are in vedere publicarea unui articol in colaborare, daca rezultatele vor fi suficient de bune.

In luna octombrie 2018 va efectua un stagiul la CIB dr Serban Peteu, cercetator la Universitatea din Michigan, SUA, in cadrul programului de mobilitati pentru cercetatorii cu experienta din diaspora, competitia 2018 organizata de UEFISCDI. In cadrul acestui stagiul dr. Serban Peteu va lucra impreuna cu dr Alina Vasilescu la CIB in vederea dezvoltarii de biosenzori pentru determinarea compusilor volatili. Se are in vedere exploatarea rezultatelor din COLDSENSOR pentru a duce mai departe detectia aldehydelor, de la detectia in faza lichida catre detectia din faza gazoasa. Se preconizeaza generarea unor idei si rezultate preliminare care sa stea la baza unor noi aplicatii de proiect.

Obiectivele proiectului COLDESENSOR si anume **obținerea și caracterizarea ALDH recombinante din *Flavobacterium* PL02 (F-ALDH)**, **caracterizarea enzimei imobilizate pe particule de magnetita și optimizarea si validarea biosenzorilor bazati pe F-ALDH pentru aplicatii biotehnologice**, au fost realizate în totalitate.

SINTEZA PROIECTULUI COLDESENSOR

Obiectivul proiectului COLDESENSOR a constat în obținerea unei noi enzime, o aldehyd dehidrogenază (ALDH) dintr-o tulpină psihrofilă de *Flavobacterium* PL02 izolată din Antarctica, pentru a fi utilizată drept catalizator stabil cu selectivitate nouă pentru procese biotehnologice la temperaturi scazute si pentru biosenzori (Fig. 1)

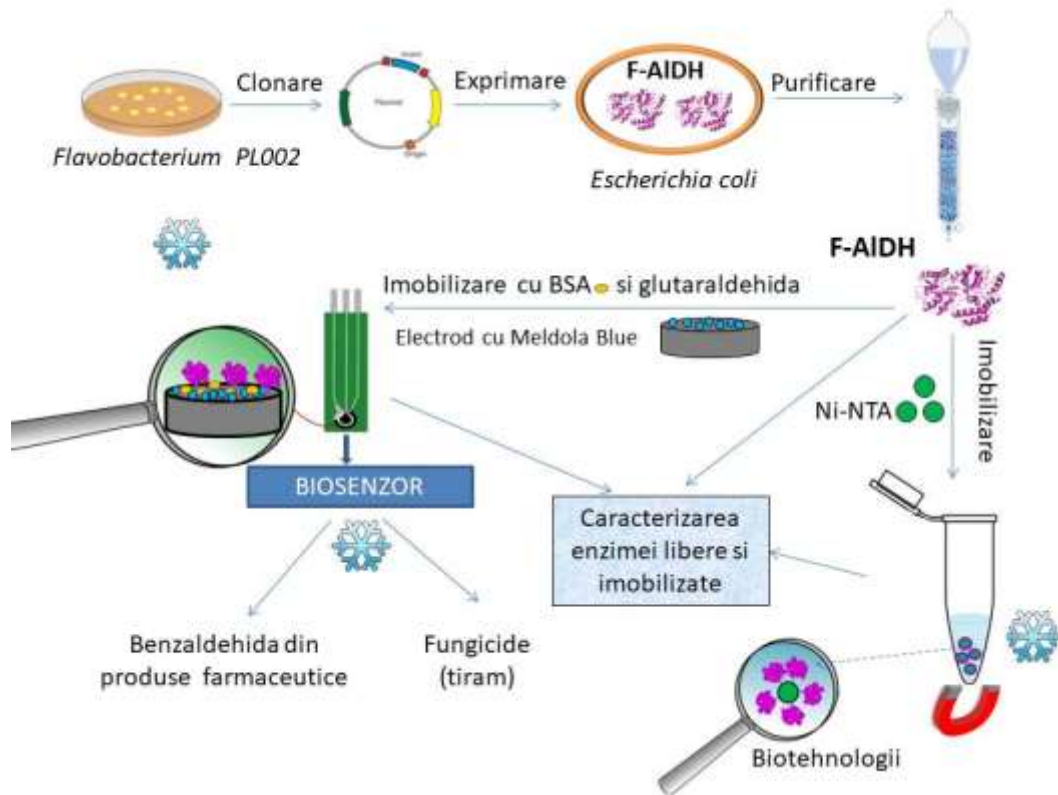


Fig.1 Reprezentarea schmatica a obiectivelor si rezultatelor proiectului COLDESENS

Enzima F-ALDH a fost obtinuta prin clonarea genei *aldh3* din *Flavobacterium* PL02, urmata de expresia proteinei recombinante F-ALDH in *Escherichia coli* BL21 (DE3) si purificarea prin cromatografie de afinitate. Enzima obtinuta catalizeaza transformarea unei palete largi de aldehide alifatiche si aromatice in acizii carboxilici respectivi si poate utiliza ambii cofactori enzimatici NAD^+ si NADP^+ . Enzima este stabila pana la 60°C iar prin depozitare la 4°C pierde 20-25% din activitate dupa 18 zile. Enzima a fost imobilizata pe microparticule superparamagnetice Dynabeads (Fig. 2) si pe rasina de Ni-agarozza si a fost caracterizata dupa imobilizare, in vederea aplicatiilor viitoare in biotehnologie.

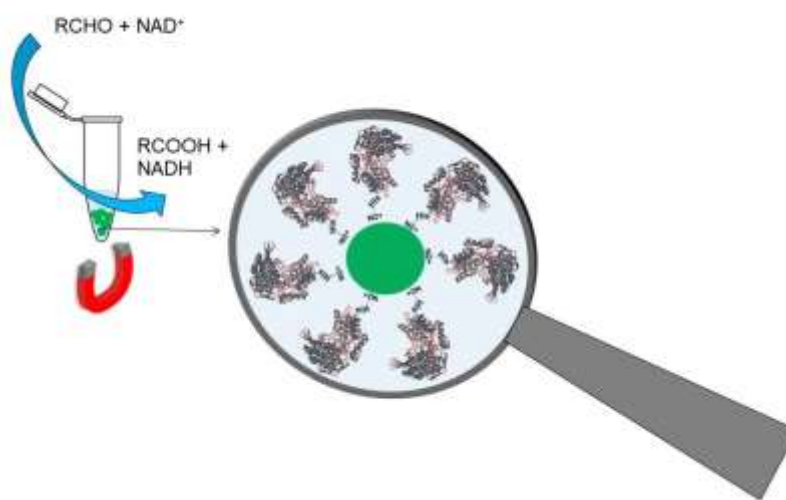


Fig. 2. Reprezentarea schematică a imobilizării F-ALDH pe microparticule superparamagnetice.

F-ALDH a fost imobilizata covalent folosind glutaraldehida si albumina bovina serica (BSA) pe suprafata unor electrozi functionalizati adecvat cu mediatorul electrochimic Meldola Blue, realizand astfel un biosenzor reutilizabil pentru detectia benzaldehidei. Metoda a fost aplicata la determinarea benzaldehidei din alcool benzilic, un agent antimicrobian folosit in industria farmaceutica (Fig. 3). Validarea in conditii de laborator a acestei metode a facut ca nivelul de maturitate tehnologica atins la finalul proiectului sa fie **TRL 4**. Un alt rezultat remarcabil rezultat din studiile de inhibitie enzimatica a activitatii F-ALDH este posibilitatea realizarii unui biosenzor de unica folosinta pentru fungicidul tiram, aceasta aplicatie de interes in controlul calitatii mediului facand obiectul unei cereri de brevet.

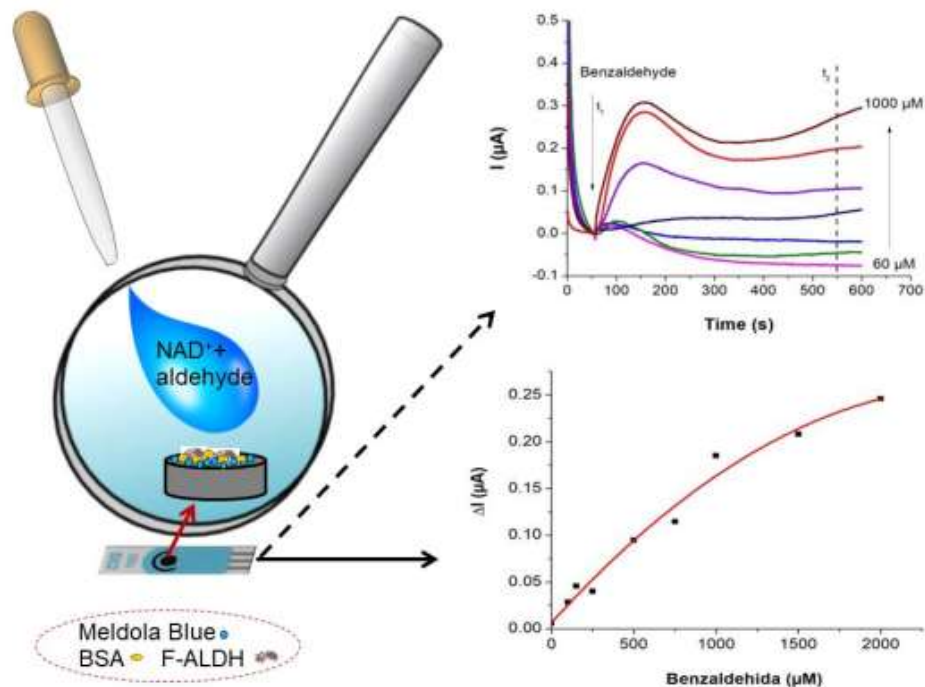


Fig. 3. Reprezentarea schematica a biosenzorului reutilizabil pentru detecția benzaldehidei (stânga), semnalele înregistrate cu biosenzorul pentru diferite concentrații de bezaldehida de la 60 μM la 1000 μM . (dreapta sus) și curba de calibrare obținută (dreapta jos)

Diseminarea rezultatelor proiectului COLDSSENSOR s-a realizat printr-o serie de publicații și prezentări la conferințe: 1 capitol de carte (Elsevier), 3 articole în evaluare și 1 în curs de redactare, 1 brevet în curs de redactare și 10 participări la conferințe internaționale (8 prezentări orale și 2 postere). În cadrul proiectului a fost organizat un workshop și vizite de lucru. Proiectul a beneficiat de suport prin stagiile efectuate de studenți de la Universitatea din Perpignan, Franța la CIB, partener în proiect. Au fost deschise mai multe perspective de colaborare cu alte instituții de cercetare din țară și străinătate și a fost depusă o aplicație de proiect EraNet, aflată în evaluare.

Dr. Cristina Purcarea
Director proiect