

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

**RAPORT ȘTIINTIFIC**

Etapa II / 2018

*Imobilizarea F-ALDH recombinante din Flavobacterium PL2 (F-ALDH), caracterizarea enzimei imobilizate și obținerea unor biosenzori pentru aplicații biotehnologice*

**Obiectivul proiectului COLDESENSOR** constă în obținerea unei noi aldehid dehidrogenaze (ALDH) dintr-o tulpină psihrofila de *Flavobacterium* PL2 izolată din Antarctica, pentru a fi utilizată drept catalizator stabil cu selectivitate nouă pentru procese biotehnologice la temperaturi scăzute. Concret, proiectul propune obținerea enzimei recombinante și imobilizarea sa pe electrozi pentru realizarea de biosenzori performanți, precum și imobilizarea enzimei pe particule magnetice cu utilitate în bioreactoare, vizând diverse aplicații industriale.

**Obiectivul etapei 2 (2018)** a constat în imobilizarea F-ALDH (Aldehid dehidrogenaza recombinantă din bacteria psihrofila *Flavobacterium* PL2) pe nanoparticule magnetice pentru aplicații biotehnologice și caracterizarea acestora și în obținerea biosenzorilor bazati pe F-ALDH pentru aplicații biotehnologice.

Etapa 2018 a presupus 3 activități, și anume:

*2.1. Caracterizarea stabilității și activității enzimice a F-ALDH imobilizate pe nanoparticule de magnetită*

În vederea imobilizării F-ALDH pe diverse suporturi și caracterizării proprietăților enzimice ale enzimei imobilizate, s-au investigat **stabilitatea enzimei libere și influența unor compuși chimici** componenți ai rășinii și ai tamponului de păstrare/imobilizare.

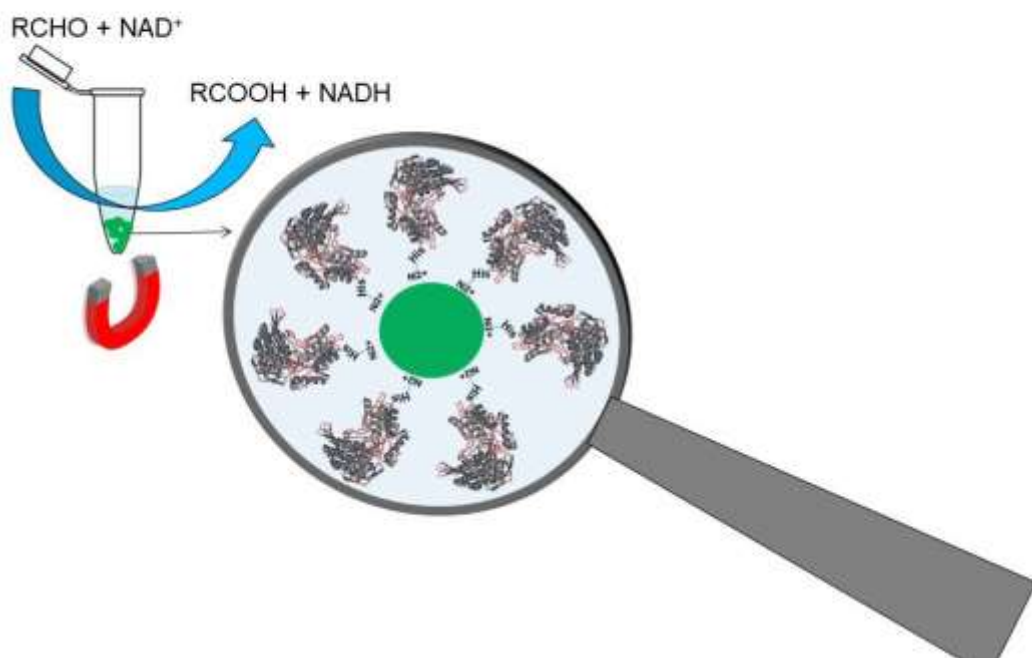
F-ALDH a fost stabilă la 4° C timp de 7 zile, cu o reducere parțială (20-37%) a activității după 18 zile la 4°C, în funcție de co-factorul folosit (NAD<sup>+</sup> respectiv NADP<sup>+</sup>).

Activitatea reziduală a F-ALDH în prezența diferiților compuși precum CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, Triton X-100, NiCl<sub>2</sub> sau EDTA raportată la activitatea enzimatică în absența acestora, indică efectul slab inhibitor (20%) al 1 mM NiCl<sub>2</sub> și 1 mM MgCl<sub>2</sub> (20%) asupra activității

enzimatică a extremozimei. De asemenea, prezența a 2 mM EDTA a avut un efect inhibitor slab (20%).

Imobilizarea F-ALDH s-a realizat pe rășina magnetică de tip Dynabeads™ (Invitrogen) și pe rășina de tip Ni-NTA (Qiagen) utilizată în etapa de purificare a enzimei recombinante prin cromatografie de afinitate.

**Principiul imobilizării F-ALDH pe particule Dynabeads™** este ilustrat mai jos:



Rășina de tip Dynabeads este alcătuită din particule superparamagnetice, uniforme, cuplate prin tehnologia IMAC cu o polipeptidă formată din resturi de șase histidine (6xHis-tag).

Imobilizarea proteinei purificate s-a realizat prin incubare la 4°C timp de 1 h în tampon fosfat 50 mM, pH = 7, 10 mM βME, După incubare, rasina a fost separata de tampon prin aplicarea unui camp magnetic puternic. După etapa de imobilizare, au fost realizate încă trei spălari ale rasinii în același mod descris mai sus pentru a îndepărta proteina legată nespecific. Prezența proteinei imobilizate s-a verificat prin electroforeza SDS-PAGE. Randamentul de imobilizare a enzimei pe Dynabeads™ a fost de 36 %,%, în timp ce pentru Ni-NTA a fost de 99%.

S-a determinat că F-ALDH își păstrează activitatea enzimatică după imobilizare. În urma conservării timp de 11 zile la 4°C, activitatea reziduală a F-ALDH imobilizate atât pe rășina magnetică Dynabeads™ cât și pe rășina Ni-NTA a scăzut la 70% din activitatea inițială.

### *Activitatea 2.2 Optimizarea și validarea biosenzorilor bazati pe F-ALDH pentru aplicatii industriale / ICB a avut drept scop*

În cadrul acestei activități au fost identificate două potențiale aplicații industriale ale biosenzorilor bazati pe F-ALDH și anume : (1) determinarea fungicidelor ditiocarbamate din ape și (2) determinarea benzaldehidei din alcool benzilic folosit ca agent microbian în produsele farmaceutice

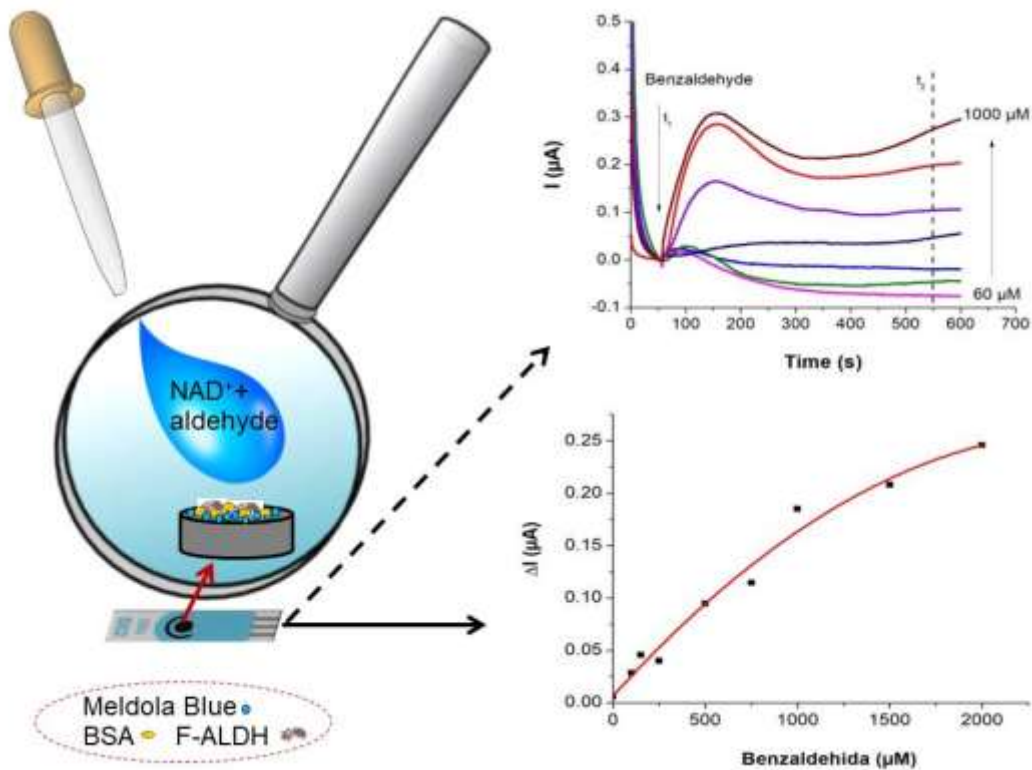
- A fost evaluată influența catorva potențiali inhibitori ai activității enzimatice a F-ALDH precum săruri ale metalelor grele ( $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ) și fungicide din clasa ditiocarbamatilor (maneb, ziram, propineb, tiuram). Dintre compuşii testați, tiuramul a prezentat un efect inhibitor semnificativ asupra F-ALDH. Detectia tiuramului cu un biosenzor de unică folosință bazat pe F-ALDH face obiectul unei aplicații de brevet în pregătire.
- Pentru determinarea benzaldehidei din alcoolul benzilic a fost dezvoltat un biosenzor reutilizabil, proces care a constat în 3 etape: (a) obținerea unui complex insolubil a mediatorului electrochimic Meldola Blue și utilizarea sa pentru obținerea de senzori electrochimici de NADH sensibili și stabili; (b) imobilizarea covalentă a F-ALDH pe suprafața senzorilor electrochimici și (c) optimizarea și validarea metodei pentru determinarea benzaldehidei din alcoolul benzilic.

Principalele rezultate înregistrate în cadrul acestei activități sunt:

- A fost realizat un senzor electrochimic de NADH stabil, integrat într-un sistem de analiză în flux FIA, caracterizat printr-o limită de detecție de 0.5  $\mu\text{M}$  NADH și un domeniu liniar de până la 400  $\mu\text{M}$ . Senzorul are la bază electrozi modificați cu nanofibre de carbon și cu un complex insolubil de Meldola Blue, raportat și caracterizat în premieră în ceea ce privește activitatea catalitică la oxidarea electrochimică a NADH.
- S-a obținut imobilizarea stabilă a F-ALDH pe suprafața senzorilor de NADH prin legare covalentă prin intermediul glutaraldehidei, într-o matrice de albumină bovină serică.

Cantitatea de enzima imobilizata pe electrozi a fost optimizata iar biosenzorul reutilizabil obtinut a fost testat folosind ca substrat enzimatic benzaldehida

- A fost dezvoltata o metoda dezvoltata pe biosenzor serigrafiat de C, modificat cu Meldola Blue si cu F-ALDH imobilizata, cu detectie prin cronoamperometrie pentru analiza benzaldehidei.
- Pentru realizarea determinarilor electrozudul este fixat orizontal, se foloseste un sistem de 3 electrozi serigrafati, care cuprinde in afara biosenzorului care este electrozudul de lucru, un electrod auxiliar de C si unul de referinta de Ag. Pe suprafata electrozilor se depune un volum de 50  $\mu\text{L}$  solutie tampon pH 10 continand 1.6 mM  $\text{NAD}^+$  (cofactorul enzimatic) si se aplica o diferenta de potential de 0.1 V. Dupa  $t_1 = 60$  s se adauga un volum de 10  $\mu\text{L}$  proba sau standard de benzaldehida si se inregistreaza intensitatea curentului electric generat in celula electrochimica la  $t_2$ , de exemplu 600 s. Diferenta intre intensitatea curentului electric la  $t_2$  si  $t_1$  este proportionala cu concentratia de benzaldehida din proba de analizat. Principiul biosenzorului este ilustrat in figura de mai jos:



Biosenzorul a fost caracterizat în ce privește limita de detecție (17  $\mu\text{M}$  benzaldehidă), domeniul liniar (80-800  $\mu\text{M}$ ), sensibilitatea, precizia, specificitatea și stabilitatea. În plus a fost determinată acuratarea metodei prin analiza unor probe de alcool benzilic în care s-au adăugat intenționat cantități de benzaldehidă de 0.095-0.5%. Rezultatele au fost validate prin analiză în paralel prin cromatografie de lichide de înaltă performanță. Datele obținute conduc la concluzia că metoda bazată pe biosenzor este adecvată determinării benzaldehydei 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.

### 2.3 Diseminarea rezultatelor / IBB, ICB

#### 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 evaluate*
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 evaluate*
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 pregatire*
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 evaluate*

## **BREVET**

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

### **CONFERINTE (3 prezentari orale, 1 poster)**

#### **1. 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**

#### **2. 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**

#### **3. International Symposium on Cryosphere and Biosphere 2018, Kyoto, Japonia, 14-19 martie 2018**

- Thermal response of pyrimidine nucleotide genes expression in psychrophilic bacteria. Mondini A, Purcarea C. - **prezentare orală**

## **STAGII SI VIZITE DE LUCRU**

### **27-30 martie 2018, vizita de lucru la Universitatea Aurel Vlaicu (UAV) din Arad - Alina Vasilescu (CIB)**

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 posibilitatea validarii rezultatelor obtinute cu biosenzorii prin analiza clasica a aldehydilor prin metode cromatografice la UAV.

### **Vizite de lucru la ICDVV Valea Calugareasca - Alina Vasilescu (CIB)**

27 februarie 2018: Au fost discutate metodele de detectie a acetaldehidei din vinuri. In prezent, acetaldehida nu mai reprezinta unul din parametrii determinati uzual in vinuri. S-a stabilit o colaborare pe tema determinarii acetaldehidei din vinuri daca se va dovedi oportun de dezvoltat in viitor un biosenzor pentru determinarea acetaldehidei.

5 martie 2018: 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 fost depusa si a fost selectata pentru etapa a doua a competitiei. 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.

**Stagiu de pregatire (1–30 iunie 2018)** - Manon Lucasson, studenta in anul II la IUT, Universitatea din Perpignan, Franta, stagiu in laboratorul de Electrochimie Aplicata din cadrul CIB, sub indrumarea Dr. Alina Vasilescu, in cadrul colaborarii cu CIB. Studiile efectuate de studenta din Perpignan vizand efectul metalelor grele si al fungicidelor ditiocarbamate asupra activitatii F-ALDH au contribuit la caracterizarea enzimei din punct de vedere al inhibitei enzimatic 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.

### **Posibilitati de colaborare si valorificarea rezultatelor proiectului**

In luna octombrie 2018 va efectua un stagiu 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 stagiu 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 COLDSSENSOR 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.

## CONCLUZII

In urma validarii biosenzorilor reutilizabili bazati pe F-ALDH pentru determinarea benzaldehidei din alcool benzilic, in conditii de laborator se estimeaza ca s-a atins la finalul proiectului pentru acest biosenzor nivelul de maturitate tehnologica 4 (TRL 4).

Rezultatele obtinute sunt sintetizate mai jos in comparatie cu cele preconizate

<b>Rezultate preconizate</b>	<b>Rezultate obtinute</b>
Raport asupra caracteristicilor enzimaticice ale F-ALDH imobilizate pe nanoparticule de magnetita	Raport asupra caracteristicilor enzimaticice ale F-ALDH imobilizate pe nanoparticule de magnetita
Publicatie referitoare la obtinerea si caracterizarea F-ALDH	Articol referitor la obtinerea si caracterizarea F-ALDH in curs de redactare Articol in pregatire „Biosensor for aldehydes detection based on a novel enzyme from a psychrophilic bacterium” Articol referitor la cuplarea F-ALDH cu un senzor electrochimic de NADH pentru detectia benzaldehidei „Carbon nanofiber and Meldola Blue based electrochemical sensor for NADH: application to the detection of benzaldehyde” trimis spre evaluare
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: 3 prezentari orale, 1 poster



Obiectivul etapei 2, 2018 a proiectului COLDSSENSOR si anume **optimizarea si validarea biosenzorilor bazati pe F-ALDH si caracterizarea enzimei imobilizate pe nanoparticule de magnetita pentru aplicatii biotehnologice**, a fost realizat în totalitate.