

CROMATOGRAFIA DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ ÎN MEDIU LICHID (HPLC) PENTRU SEPARAREA UNOR DERIVAȚI METABOLICI DIN *ARTHROBACTER NICOTINOVORANS*

- Lucrare de licență -



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

Boianiu Răzvan Ștefan*

Facultatea de Biologie, Universitatea Alexandru Ioan Cuza din Iași

Coordonator științific: Lect. Dr. Marius Mihășan

*boianiu.razvan@yahoo.com

Cuprins

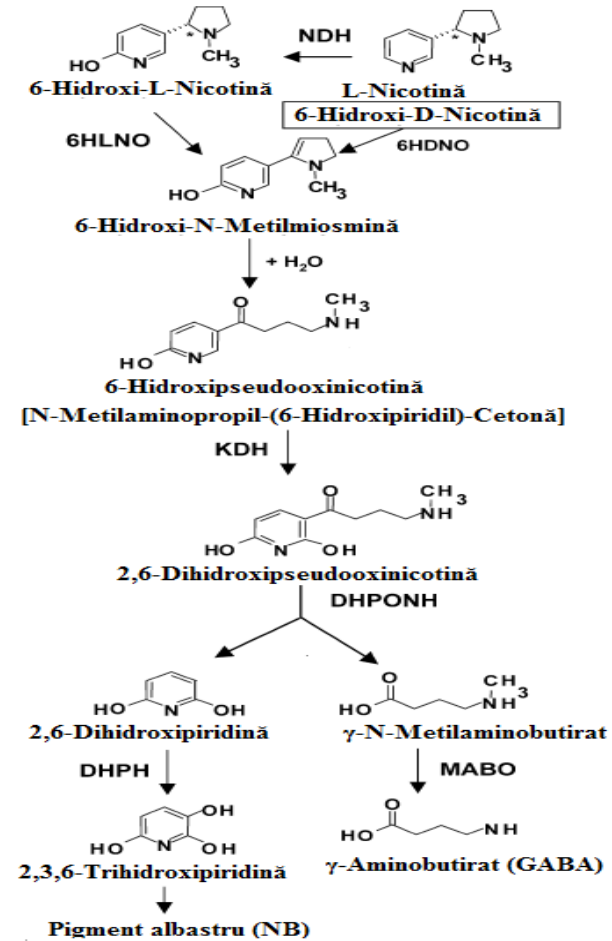
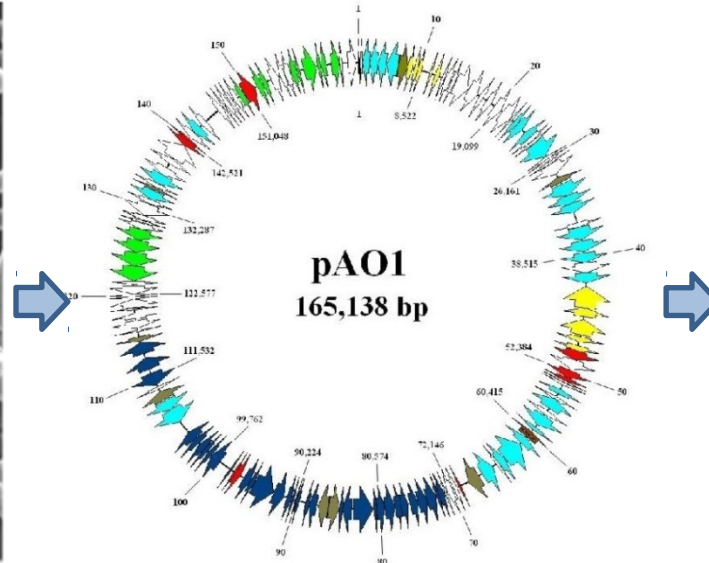
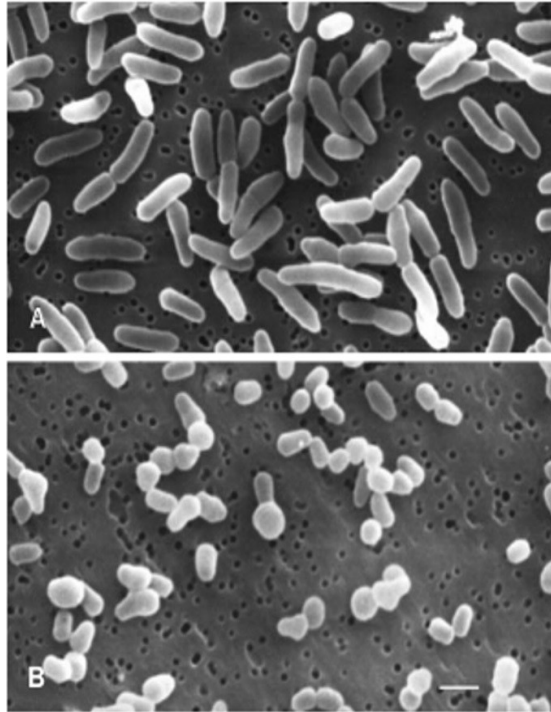
- CARACTERIZAREA TAXONOMICĂ ȘI FIZIOLOGICĂ A SPECIEI *ARTHROBACTER NICOTINOVORANS*
- APLICAȚII BIOTEHNOLOGICE ALE CĂII DE DEGRADARE A NICOTINEI DIN *ARTHROBACTER NICOTINOVORANS*
- MATERIALE ȘI METODE
- REZULTATE ȘI DISCUȚII
- CONCLUZII

Arthrobacter nicotinovorans și pAO1



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro



Prokaryotes (2006) 3:945–960
DOI: 10.1007/0-387-30743-5_36

Appl Microbiol Biotechnol (2006) 69: 493–498
DOI 10.1007/s00253-005-0226-0

CHAPTER 1.1.21

MINI-REVIEW

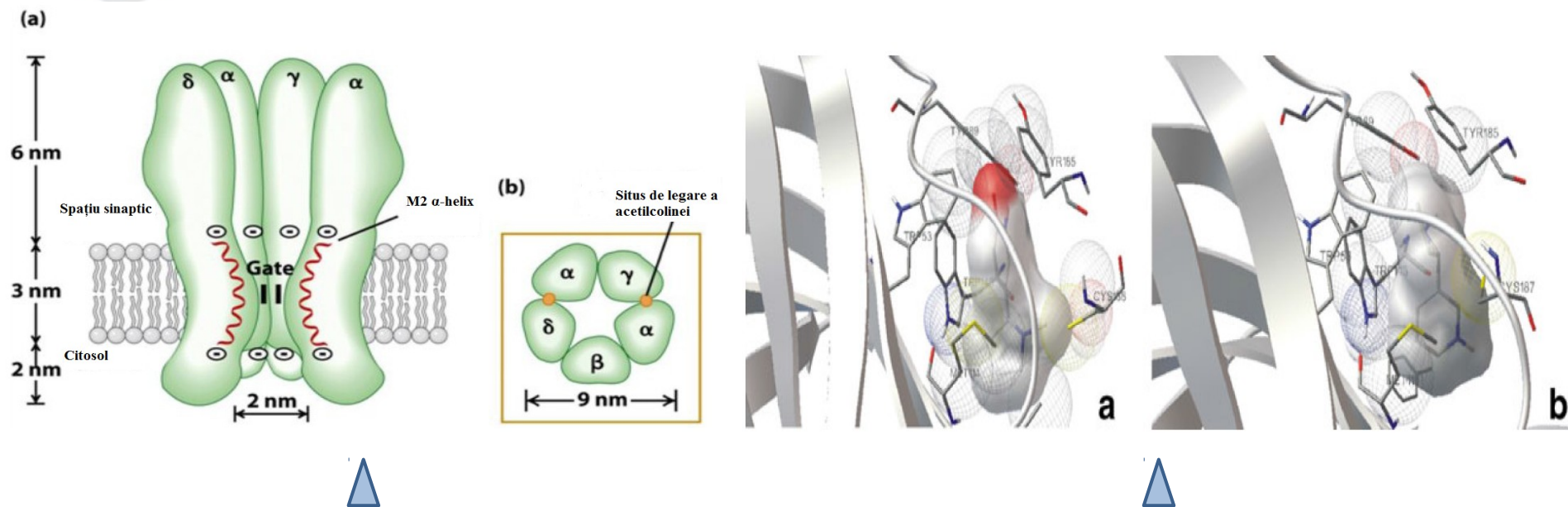
The Genus *Arthrobacter*

Roderich Brandsch

DOROTHY JONES AND RONALD M. KEDDIE

Microbiology and biochemistry of nicotine degradation

6HNic – un posibil medicament?



Reprezentarea schematică a unui receptor nAChR arătând (a) încorporarea în membrană, spațiul sinaptic, citosolul și (b) situsurile de legare a acetilcolinei.

Poziția de legare a 6HNic (a) și a nicotinei (b) așa cum este prezentat prin experimente de atașare *in silico*.

Conotoxins Targeting Nicotinic Acetylcholine Receptors: An Overview

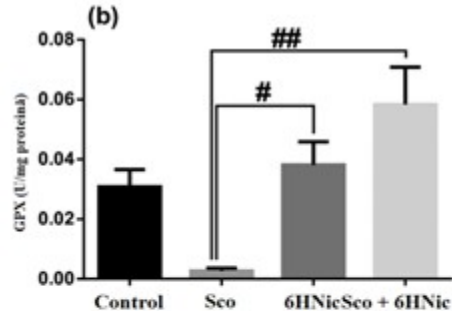
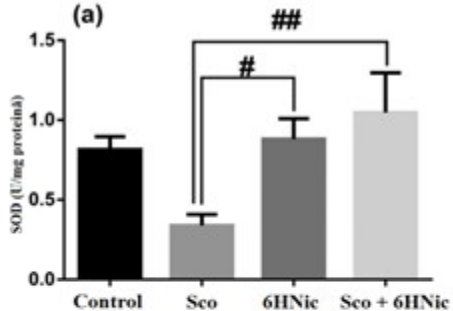
Eline K. M. Lebbe, Steve Peigneur, Isuru Wijesekara and Jan Tytgat *

Toxicology and Pharmacology, KU Leuven (University of Leuven), O&N2 P.O.Box 922, Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgium; E-Mails: eline.lebbe@pharm.kuleuven.be (E.K.M.L.); steve.peigneur@pharm.kuleuven.be (S.P.); wijesekaraliyanageisuru.wijesekara@pharm.kuleuven.be (I.W.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jan.tytgat@pharm.kuleuven.be; Tel.: +32-16-323404; Fax: +32-16-323405.

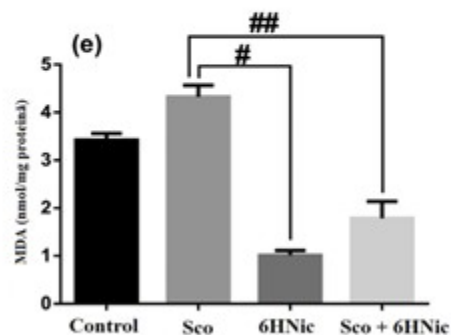
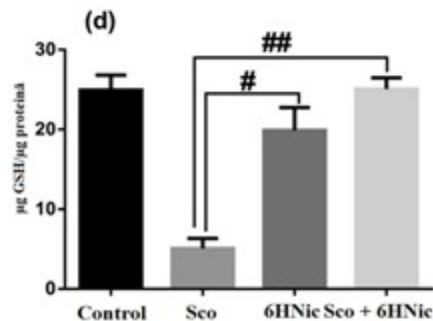
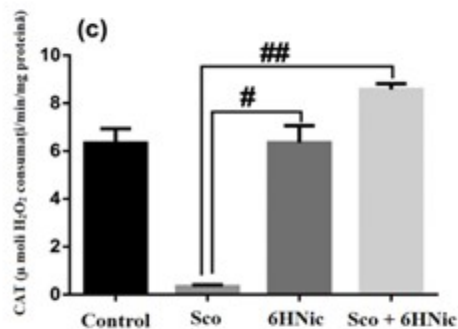
6-hydroxy-L-nicotine from *Arthrobacter nicotinovorans* sustain spatial memory formation by decreasing brain oxidative stress in rats

Lucian Hritcu · Marius Stefan · Roderich Brandsch · Marius Mihasan



Posibile metode de producere a 6HNic:

- ❖ Sinteza chimică;
- ❖ Izolarea și utilizarea enzimei NDH;
- ❖ Izolarea din mediul de cultură;



Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară, TOM XIV, 2013

MOLECULAR GENE CLONING OF NICOTINE-DEHYDROGENASE FROM THE pAO1 MEGAPLASMID OF *ARTHROBACTER NICOTINOVORANS*

ANDREEA ANDREI^{1*}, MARIUS MIHĂȘAN¹

Keywords: *Arthrobacter*, nicotine, 6-hydroxy-nicotine, megaplasmid

Abstract: 6-hydroxy-L-nicotine (6HNic) has an important potential as a drug for neuro-degenerative disorders and a suitable simple and reliable method for obtaining contaminant-free 6HNic preparations is required. Here, we envision the *in-vitro* production of 6HNic by using purified nicotine-dehydrogenase (NDH) followed by HPLC or capillary electrophoresis techniques and we focus on the isolation and cloning of the three genes coding the NDH enzyme. A PCR protocol was established for easy amplification and the DNA fragment containing the *ndhLSM* genes was directionally cloned into the pART2 vector.



Research article

Enhanced behavioral response by decreasing brain oxidative stress to 6-hydroxy-L-nicotine in Alzheimer's disease rat model

Lucian Hritcu^{2,4*}, Marius Stefan³, Roderich Brandsch⁵, Marius Mihasan²

¹ Department of Biology, Alexandru Ioan Cuza University of Iasi, Bd. Carol I No. 11, 700506, Romania
² Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Centre for Biochemistry and Molecular Cell Biology, Albert-Ludwigs-University Freiburg, Hermann Herder-Strasse 7, Freiburg, Germany

www.uaic.ro



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

6HNic – un posibil medicament?

Materiale și metode



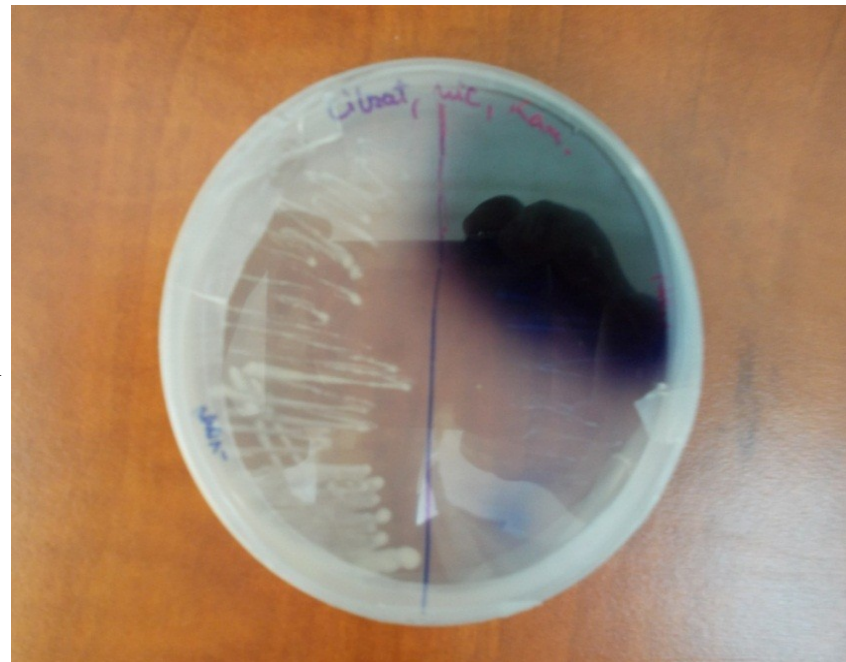
UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

Tulpini utilizate și condiții de creștere:

Anthrobacter nicotinovorans pAO1+, pAO1- cultivate în mediul citrat suplimentat cu nicotină 0.05% și 0.005 % soluție de minerale pe un agitator rotativ la 28°C/190 rpm.*

Spectrele de absorbție: au fost înregistrate pe un spectrofotometru Beckman Coulter DU 730 Life Science utilizând mediu citrat ca etalon



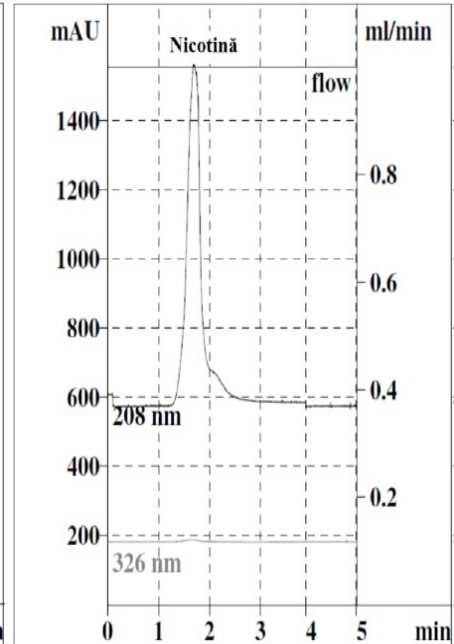
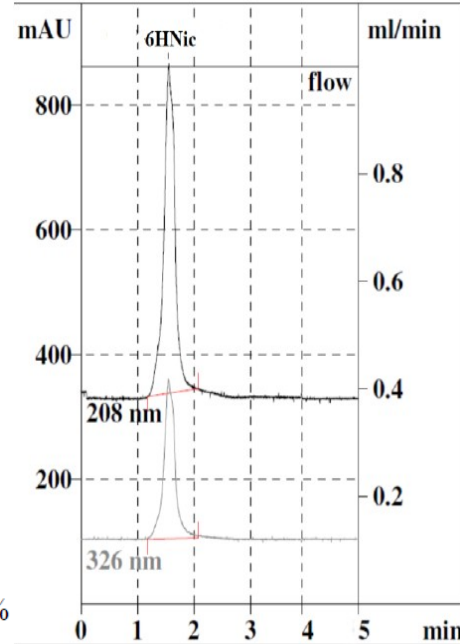
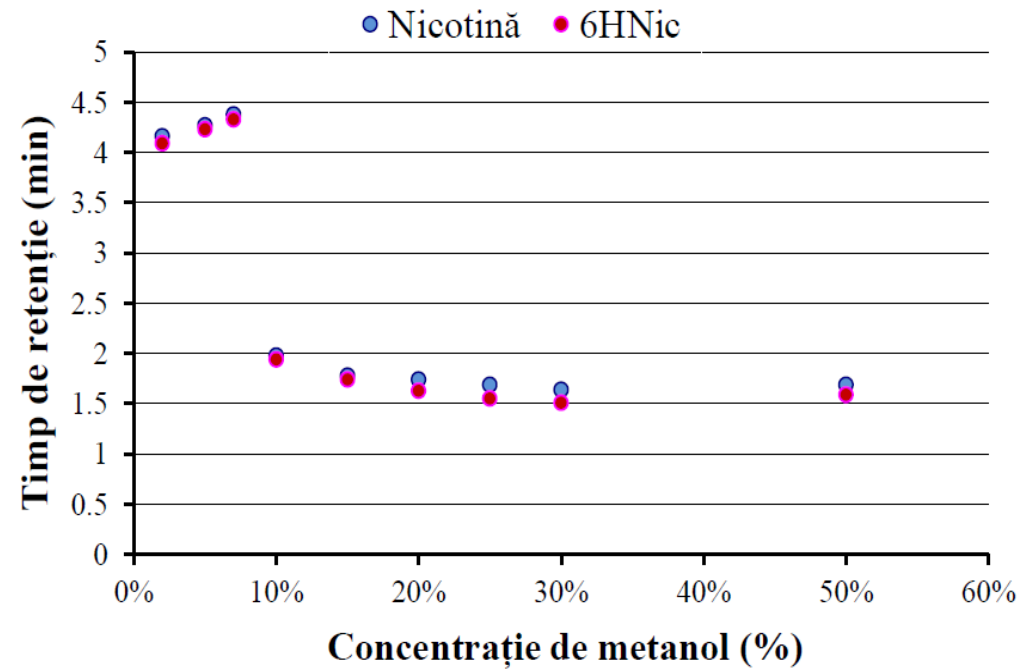
Analiza HPLC a fost realizată pe un sistem Bischoff echipat cu 2 pompe, un detector DAAD, și o coloană Nucleodur RP C18 ec (150x4.6 mm, cu dimensiunea particulei de 3μm).

*Eberwein, H., Gries, F. A., Decker, K. (1961): [On the decomposition of nicotine by bacterial enzymes. II. Isolation and characterization of a nicotine-splitting soil bacterium]. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, 323, 236–



1. Stabilirea condițiilor optime pentru separarea 6HNic de nicotină

Coloană cromatografică	Fază mobilă	Raport	Debit/temperatură	Deteție	Referință
Kromasil KR100-5C18, 150mm×4.6mm; dimensiunea particulei este de 5μm	Metanol:1 mM H ₂ SO ₄	15:85	0,5 ml/ min / 30°C	210 nm	(Wang et al., 2005)
Kromasil KR100-5C18, 150mm×4.6mm; marimea particulei 5μm	Metanol:1 mM H ₂ SO ₄	25:75	0,5 ml/ min / 30°C	207 nm	(Tang et al., 2008)
Kromasil KR100-5C18, 150mm×4.6mm; dimensiunea particulei este de 5μm	Apă distilată:Metanol	75:25	0,5 ml/ min / 30°C	210 nm	(Tang et al., 2009)
Grace Alltima C18, 4.6×250 mm; dimensiunea particulei este de 5μm	Metanol:Apă distilată	10:90	0,5 ml/ min / 30°C	263 nm; 232 nm; 307 nm	(Ma et al., 2014)
Eclipse XDB-C18, 250×64.6 mm; dimensiunea particulei este de 5μm	Metanol:1 mM H ₂ SO ₄	5:95	0,5 ml/ min / 30°C	-	(Liu et al., 2014)



Dependența timpilor de retenție față de concentrația de metanol

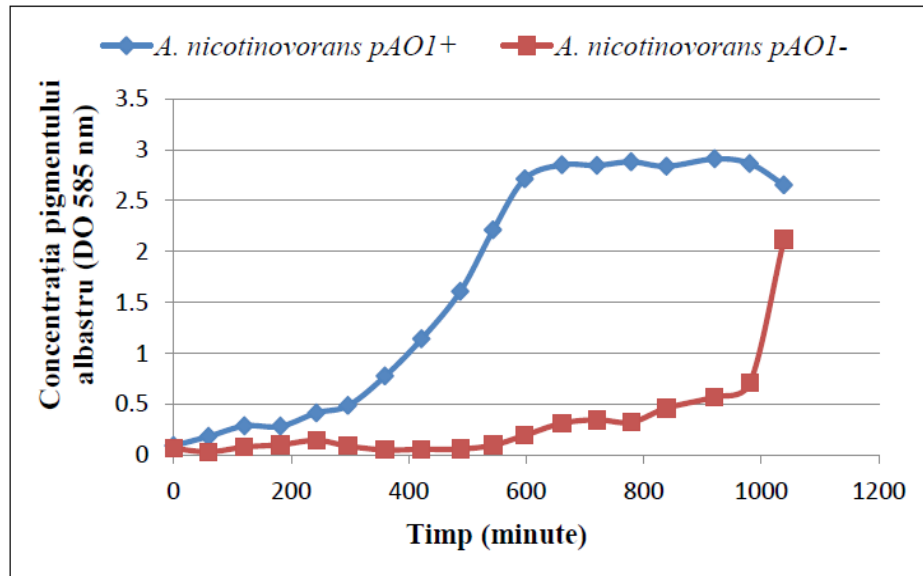
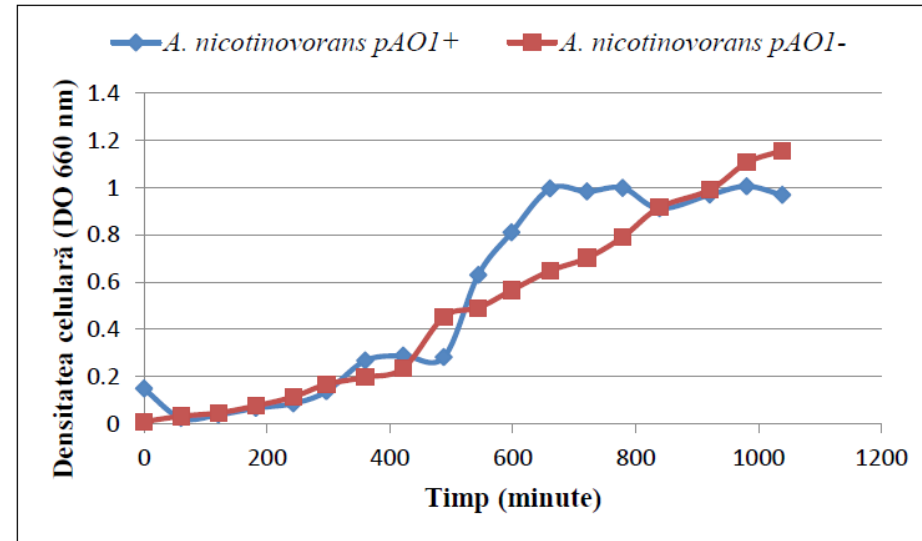


Cromatograme tipice pentru separarea nicotinei și a 6HNic folosind ca fază mobilă un amestec de acid sulfuric 1mM și metanol în raport de 75:25

Cea mai eficientă separare => acid sulfuric 1mM și metanol în raport de 75:25

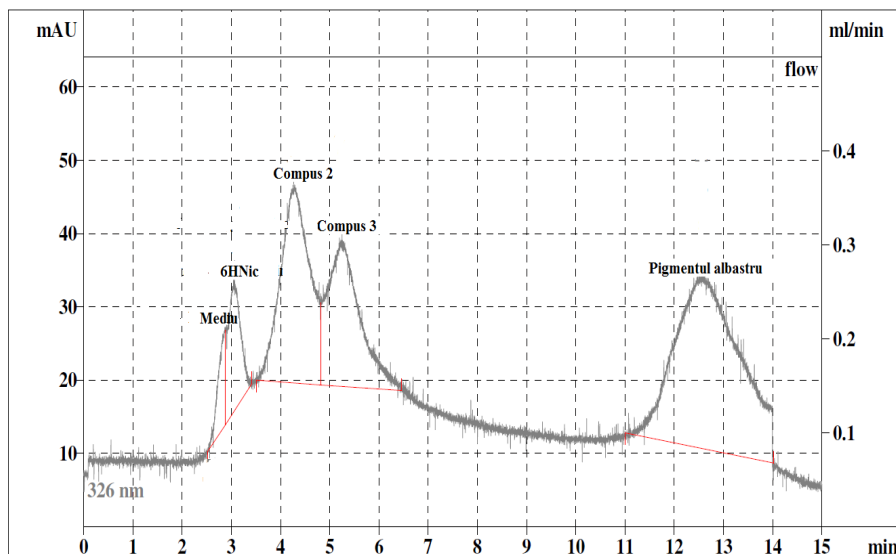
2. Dezvoltarea microorganismului *Arthrobacter nicotinovorans* pe medii cu nicotină

Curba de creștere a tulpinilor de *A. nicotinovorans* pAO1+ și pAO1- pe mediu cu nicotină



Acumularea pigmentului albastru în dependență de timp

3. Separarea cromatografică a mediului de cultură din *Arthrobacter nicotinovorans*



Separarea cromatografică a compuşilor din mediul de cultură a tulpinei *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1

- Prezența în cromatograme a primului intermediar metabolic indică faptul că faza mobilă folosită este cea care asigură separarea cromatografică a 6HNic din mediul de cultură.



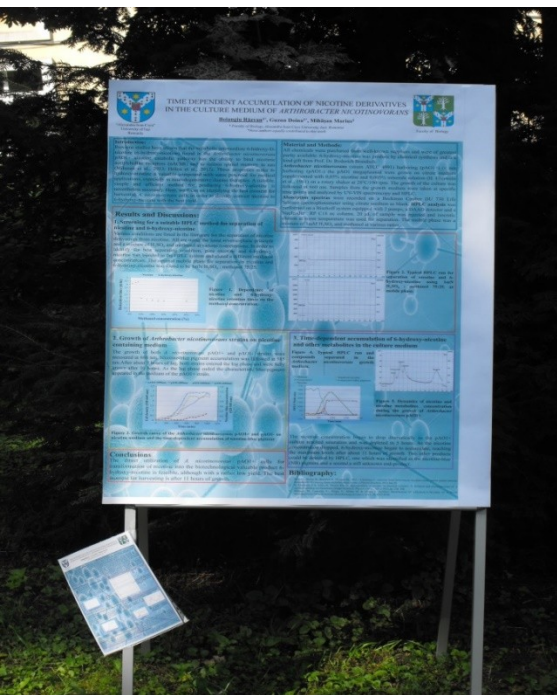
Concluzii



- S-a reușit stabilirea unui protocol de separare a intermediarilor metabolici ai nicotinei ce apar în mediul de cultură a microorganismului *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+
- Faza mobilă optimă pentru separarea nicotinei de 6HNic este compusă din acid sulfuric 1mM și metanol în raport de 75:25.
- Utilizarea directă a celulelor de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+ cu scopul de a transforma nicotina într-un compus cu potențial biotehnologic precum 6HNic este realizabilă.

Rezultatele obținute au permis:

Conferințe



BOIANGIU Răzvan Ștefan, GUZUN Doina, MIHĂȘAN Marius, Time dependent accumulation of nicotine derivatives in the culture medium of *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, **1st edition "Young Researchers in BioScience International Symposium", Cluj-Napoca, România 23-27 Iulie 2014;**

GUZUN Doina, **BOIANGIU Răzvan Ștefan**, MIHĂȘAN Marius, Dinamica acumulării derivaților nicotinicici în mediile de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, **Conferința științifică anuală a Facultății de Biologie, UAIC, "Conservarea biodiversității în contextul dezvoltării durabile", Iași, România 23-25 Octombrie 2014;**

GUZUN Doina, **BOIANGIU Răzvan Ștefan**, MIHĂȘAN Marius, Dinamica acumulării derivaților nicotinicici în mediile de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, **Sesiunea națională de comunicări științifice studențești, Ediția a XIX-a, Etapa a I-a, USM, Chișinău, R. Moldova 17 Martie 2015;**

GUZUN Doina, **BOIANGIU Răzvan Ștefan**, MIHĂȘAN Marius, Dinamica acumulării derivaților nicotinicici în mediile de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, **Sesiunea națională de comunicări științifice studențești, Ediția a XIX-a, Etapa a II-a, USM, Chișinău, R. Moldova 13-14 Mai 2015;**

Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară, TOM XV, 2014

TIME DEPENDENT ACCUMULATION OF NICOTINE DERIVATIVES IN THE CULTURE MEDIUM OF *ARTHROBACTER NICOTINOVORANS* pAO1

RĂZVAN BOIANGIU¹, DOINA GUZUN¹, MARIUS MIHĂȘAN^{1*}

Keywords: *Arthrobacter*, catabolic megaplasmid, nicotine, 6-hydroxy-L-nicotine, HPLC, biotechnology.

Abstract: Previous studies have shown that the metabolic intermediate 6-hidroxy-D-nicotine (6HNic) found in the *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+ nicotine catabolic pathway has the ability to bind nicotinic acetylcholine receptors and to sustain spatial memory in rats. These properties make 6HNic a valuable compound with some potential for medical applications, thereby a suitable, simple and efficient method for producing 6-hidroxy-D-nicotine is necessary. Here, we focus on identifying the best moment for harvesting *A. nicotinovorans* cells in order to directly convert nicotine to 6HNic with the best yield. The growth of *A. nicotinovorans* pAO1+ was monitored and the correlation between the growth phases and nicotine metabolism was established. After about 5 hours of lag, the strain entered the log phase and was fully grown after 10 hours. The nicotine concentration began to drop dramatically as the pAO1+ culture reached saturation and was depleted in 5 hours. As the nicotine concentration dropped, 6HNic began to accumulate, reaching the maximum levels after about 11 hours of growth. Two other products could be detected by HPLC, one which was identified as the nicotine-blue (NB) pigment and a second a still unknown end-product.



CROMATOGRAFIA DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ ÎN MEDIU LICHID (HPLC) PENTRU SEPARAREA UNOR DERIVAȚI METABOLICI DIN *ARTHROBACTER NICOTINOVORANS*



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

