

INFLUENȚA UNOR INHIBITORI AI 6-HIDROXI-L-NICOTIN-OXIDAZEI ASUPRA ACUMULĂRII 6-HIDROXI- NICOTINEI ÎN CONDIȚII DE BIOREACTOR



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

Culbece Elena-Loredana

Facultatea de Biologie, Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Iași

Coordonator științific: Prof. Dr. Habil. Mihășan Marius



Capitolul I. 6-hidroxi-nicotina - proprietăți și modalități de obținere

Capitolul II. 6-hidroxi-L-nicotin-oxidaza - caracterizare cinetico-enzimatică și structurală

Capitolul III. Metode de cercetare

Capitolul IV. Rezultate și discuții

Concluzii

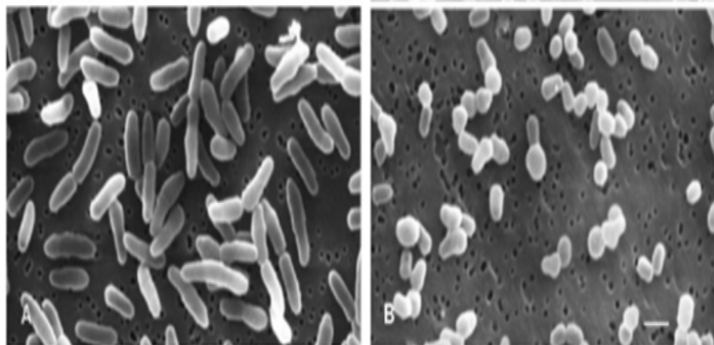
Paenarthrobacter nicotinovorans – sursă importantă de 6-hidroxi-nicotină



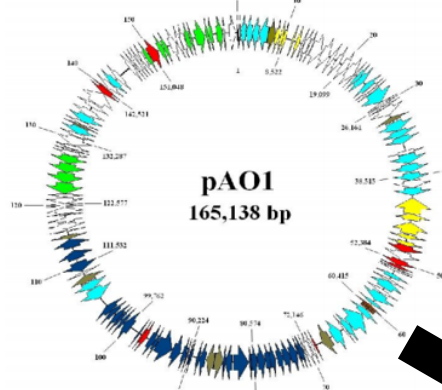
UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

P. nicotinovorans

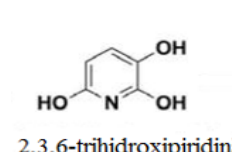
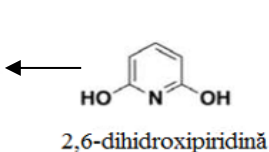
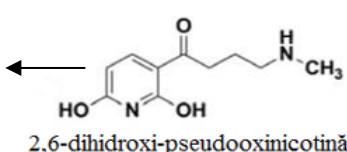
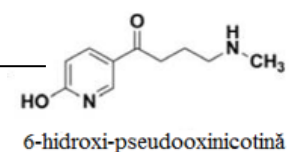
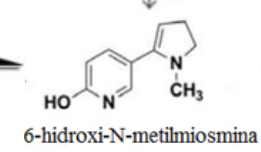
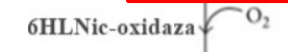
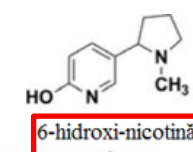
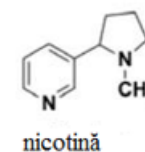


Megaplasmidul pAO1



Nicotiana tabacum

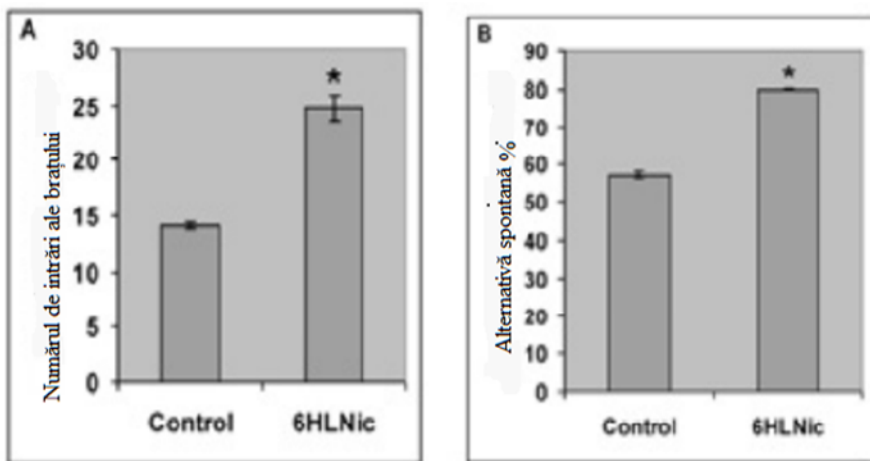
- Este o actinobacterie Gram pozitivă
- Prezintă un metabolism foarte versatil
- Are abilitatea de a metaboliza nicotina



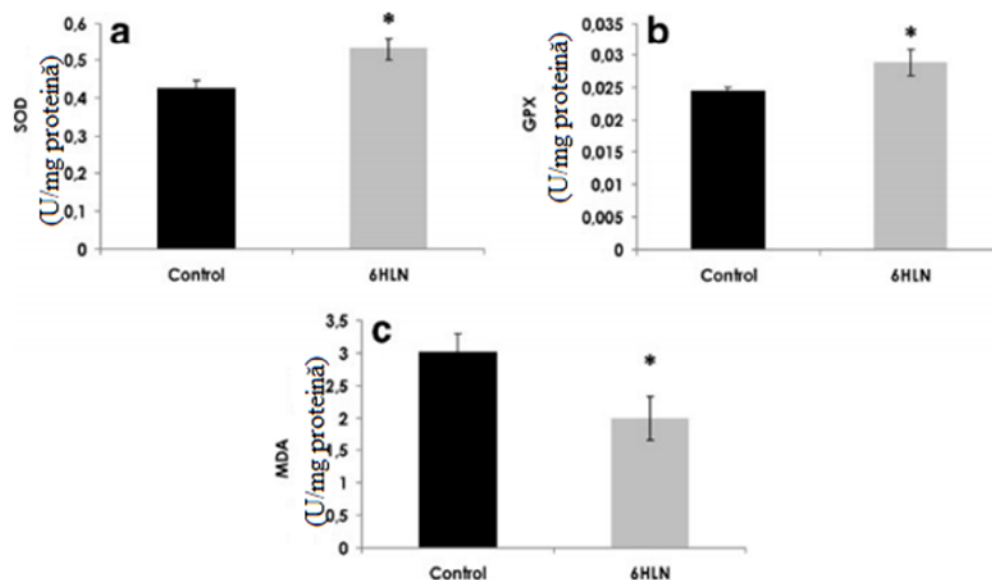
- Jones, D., Keddie, R.M.(2006): The Genus *Arthrobacter*. The Prokaryotes, pp.945-960.
- Brandsch Roderich (2006): Microbiology and biochemistry of nicotine degradation. Appl Microbiol Biotechnol, pp. 493-494.



Efectele tratamentului 6HNic la șobolanii supuși testului Y-labirint



Efectele administrării 6HNic asupra activității SOD, GPX și MDA



- **Hrițcu Lucian, Ștefan Marius, Mihășan Marius, Brandsch Roderich** (2010): 6-hydroxy-L-nicotine from *Arthrobacter nicotinovorans* facilitate spatial memory formation in rats. *Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza”*, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară, TOM XI, 2010.
- **Hrițcu Lucian, Ștefan Marius, Brandsch Roderich, Mihășan Marius** (2013): 6-hydroxy-L-nicotine from *Arthrobacter nicotinovorans* sustain spatial memory formation by decreasing brain oxidative stress in rats. *J Physiol Biochem*, 69:25-34.

6 hidroxil-L-nicotin-oxidaza



Studii de inhibiție asupra activității enzimei 6HLNO

Substanța adăugată	Concentrația (M)	Grad de inhibiție (%)
Ureea	4	38
Ureea	7,2	93
Benzoat	$5 \cdot 10^{-4}$	0
EDTA	$1 \cdot 10^{-3}$	2
EDTA	$9 \cdot 10^{-3}$	4
o-fenantrolina	$1 \cdot 10^{-3}$	4
o-fenantrolina	$9 \cdot 10^{-3}$	69
o-fenantrolina după dializa (3ore) și adăugarea de:	$9 \cdot 10^{-3}$	11
FeSO ₄	$5 \cdot 10^{-5}$	11
ZnSO ₄	$5 \cdot 10^{-5}$	57
Na ₂ MoO ₄	$5 \cdot 10^{-5}$	12
N-etil maleimida	100	9
DTNB	100	7

Scopul



Testarea
eficienței unor
inhibitori
asupra 6HLNO



6HNic

BRENDA - Information on EC 1.5.3.5 - (S)-6-hydroxynicotine oxidase

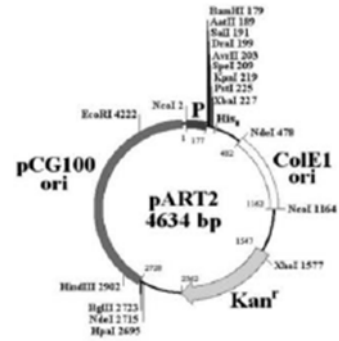


Information on EC 1.5.3.5 - (S)-6-hydroxynicotine oxidase

New: Word Map on EC 1.5.3.5

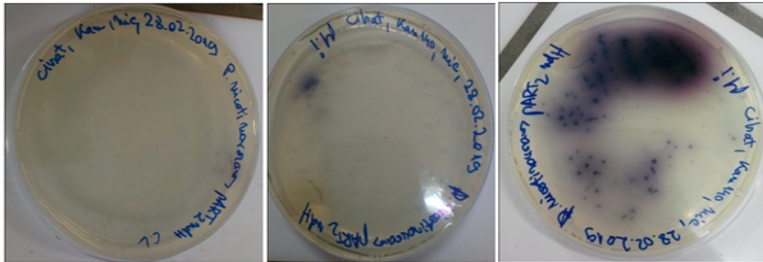


❖ Tulpina utilizată și condițiile de creștere:



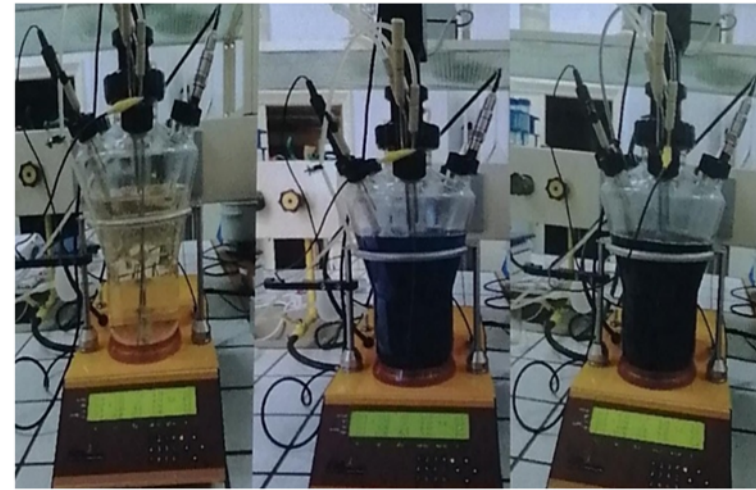
Cultivată pe mediul citrat cu soluție de minerale 5%, nicotină 0,05% și kanamicină 140 $\mu\text{g/ml}$

P. nicotinovorans
pART2ndh



Precultura- incubator cu agitare, 28°C, 190 rpm, 48 de ore

Bioreactor LAMBDA Minifor cu vas de cultură de 3L



Tulpina a fost cultivată în bioreactor timp de 60 de ore, la 28°C, la un nivel de agitare de 5Hz, la un nivel de aerare de 0,1L aer/min și ZnSO_4 0,1 mM, respectiv 0,2 mM.



Identificarea și cuantificarea Nic și 6HNic – cromatografie de înaltă performanță în mediul lichid (HPLC)



Sistem HPLC Shimadzu Prominence:

- 2 Pompe LC20AD;
- Degazificator DGU-20A5;
- Coloană Zorbax Eclipse XDB-C18,5 μm 80 Å;
- Injector SIL20AC;
- Cuptor CT20AC;
- Detector (UV-VIS) SPD M20A DAD;
- Shimadzu LC solution Software.

Faza mobilă: acid sulfuric 1 mM : metanol 99% \longrightarrow 75 : 25

Debit: 1mL/min

20 μl probă \longrightarrow 10 min, 30°C $\begin{cases} \longrightarrow \text{Nic: } \lambda=250 \text{ nm} \\ \longrightarrow \text{6HNic: } \lambda=290 \text{ nm} \end{cases}$

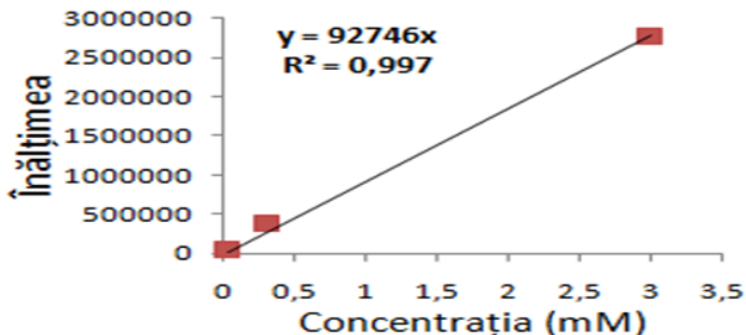
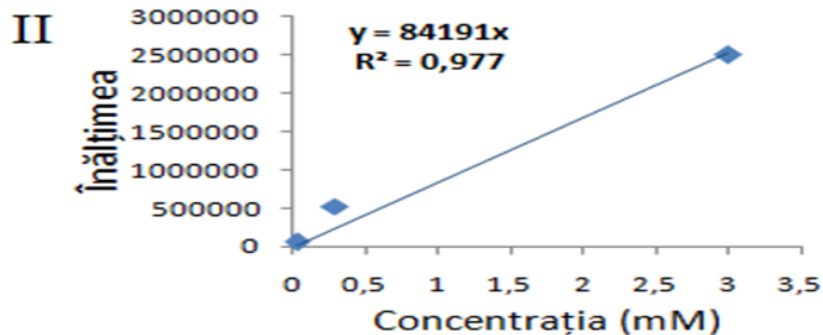
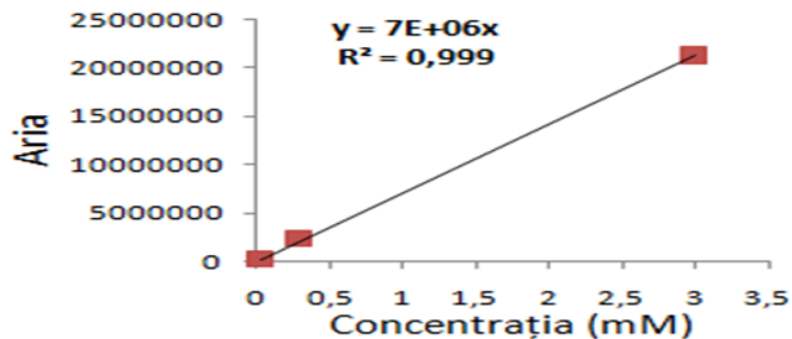
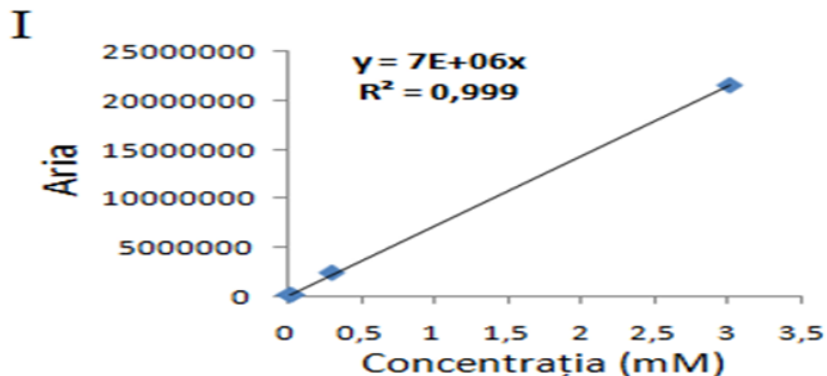
Curba de calibrare: Nic - 0.03 mM, 0.3 mM, 3 mM

6HNic - 0.03 mM, 0.3 mM, 3 mM

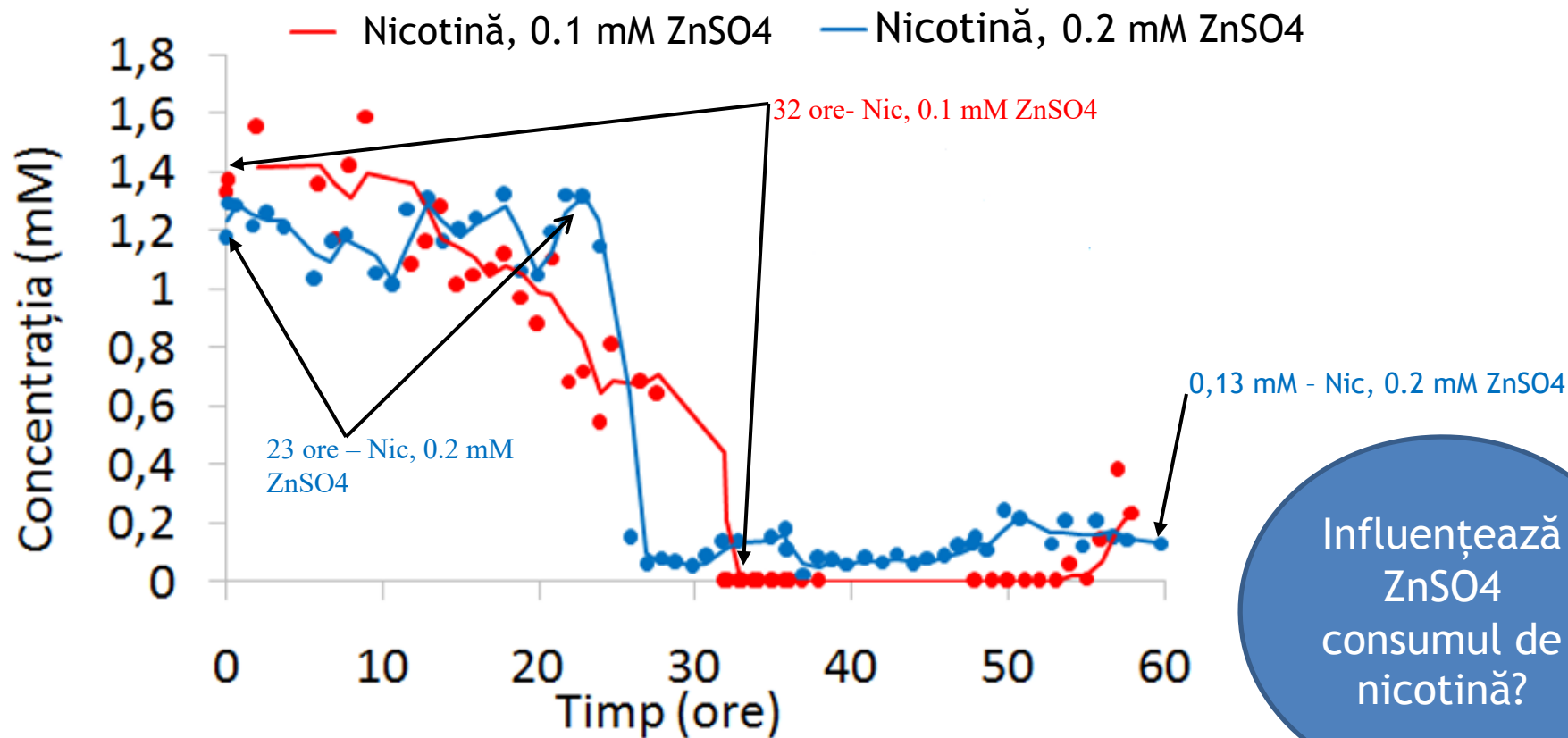


Drepte de calibrare pentru nicotină

Drepte de calibrare pentru 6HNic



Dinamica consumului de nicotină



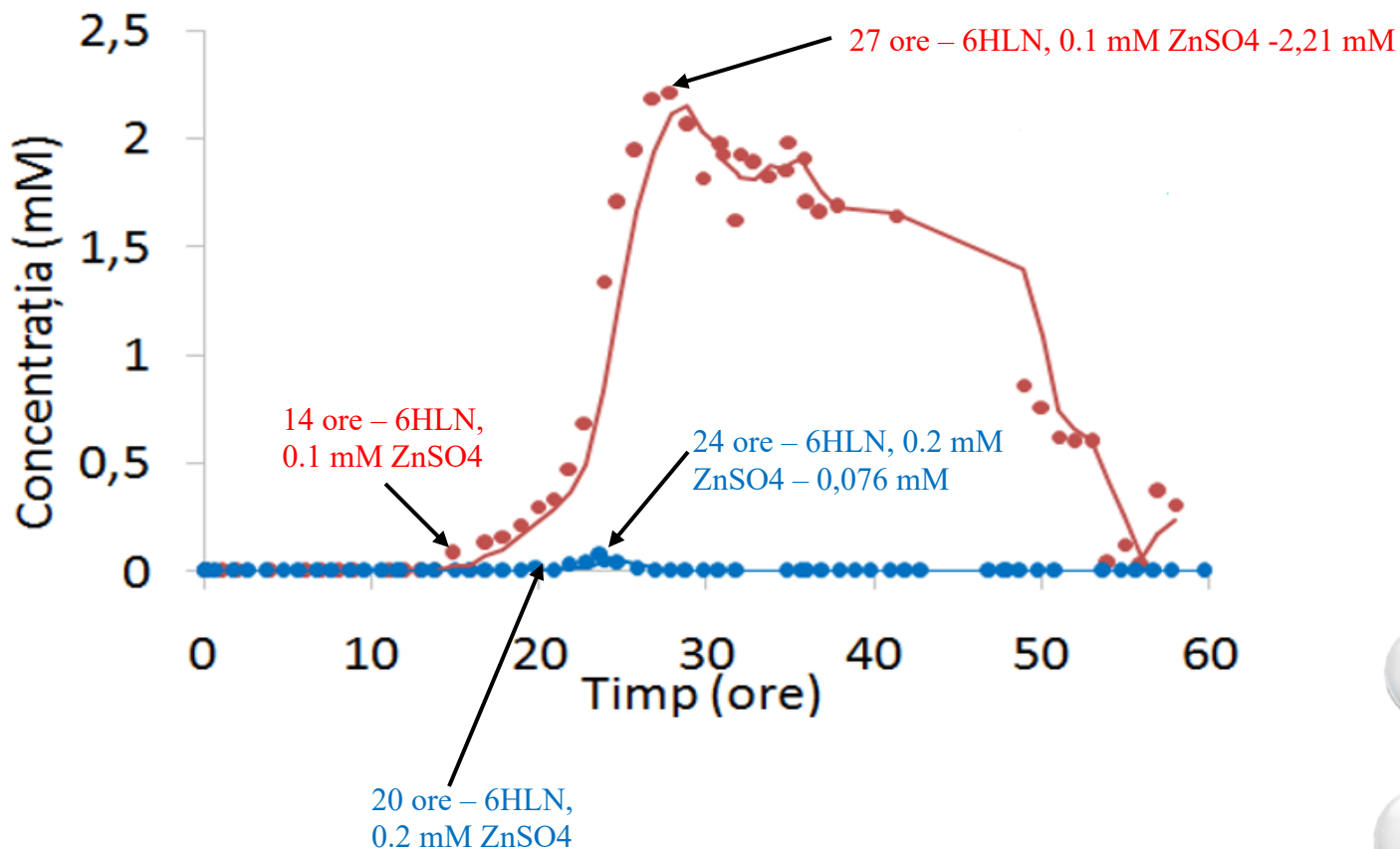
Influențează ZnSO4 consumul de nicotină?



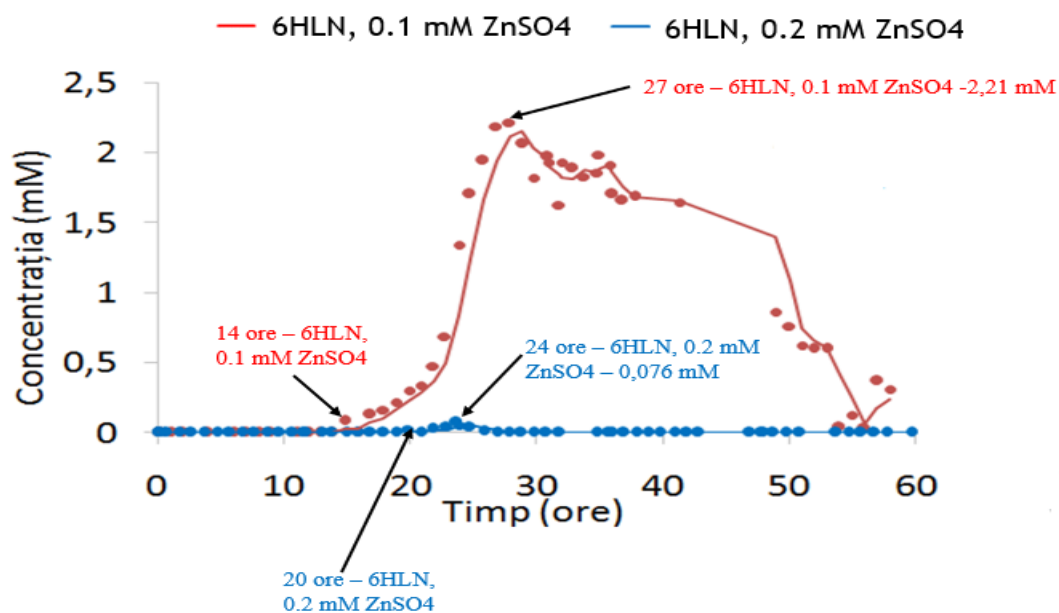
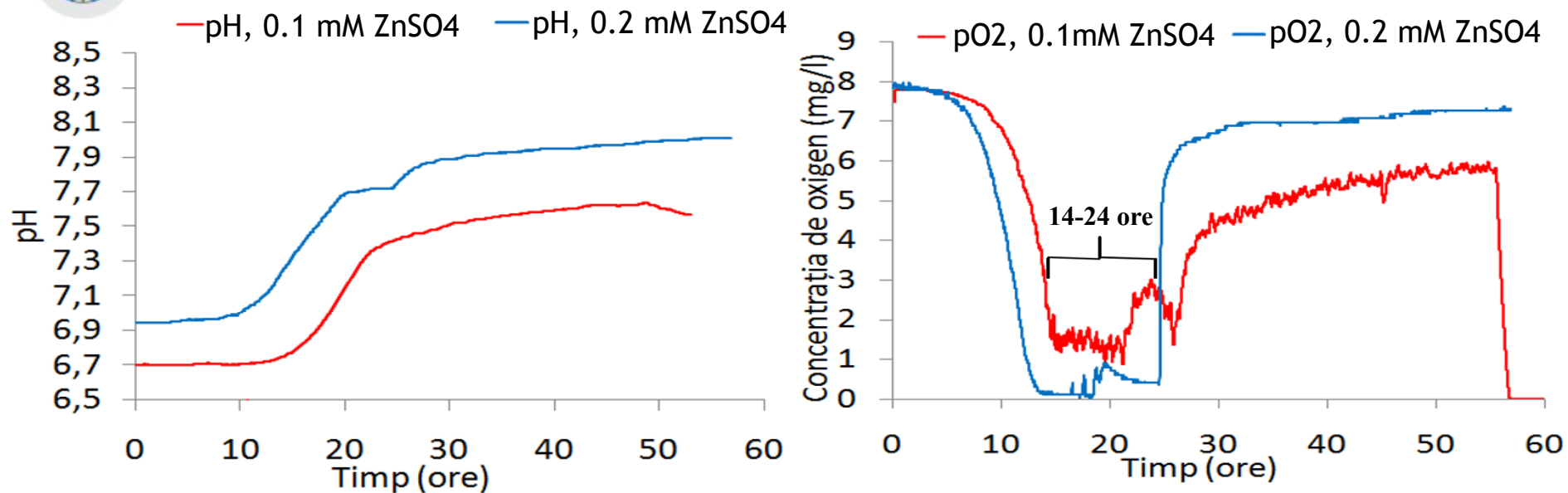
Dinamica acumulării 6HLN



— 6HLN, 0.1 mM ZnSO4 — 6HLN, 0.2 mM ZnSO4



pH-ul/concentrația de O₂ vs acumularea 6HNic





1. Tulpina recombinată genetic, *P. nicotinovorans* pART2ndh, are capacitatea de a acumula o cantitate destul de importantă de 6HNic, în prezența inhibitorului $ZnSO_4$ de concentrație 0,1 mM.
2. $ZnSO_4$ de concentrație 0,2 mM a dus la metabolizarea rapidă a 6HNic, prin urmare creșterea concentrației inhibitorului determină apariția unei cantități mai mici de 6HNic într-un timp scurt.
3. Monitorizarea în timp real a variației pH-ului, precum și concentrația oxigenului dizolvat, oferă un avantaj mare referitor la identificarea momentului acumulării unei cantități maxime de 6HNic.