



UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

FACULTATEA DE BIOLOGIE

SPECIALIZAREA BIOCHIMIE

LUCRARE DE LICENȚĂ

Coordonator științific:

Lect. Dr. Marius Mihășan

Absolvent:

Boianiu Răzvan Ștefan

Iași

Iulie 2015



UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

FACULTATEA DE BIOLOGIE

SPECIALIZAREA BIOCHIMIE

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

LUCRARE DE LICENȚĂ

Coordonator științific:

Lect. Dr. Marius Mihășan

Absolvent:

Boianțiu Răzvan Ștefan

Iași

Iulie 2015



# CUPRINS

INTRODUCERE .....	1
I. CARACTERIZAREA TAXONOMICĂ ȘI FIZIOLOGICĂ A SPECIEI <i>ARTHROBACTER NICOTINOVORANS</i> .....	3
I.1. Încadrarea taxonomică a specie <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> .....	3
I.2. Caracteristici metabolice și morfologice ale genului <i>Arthrobacter</i> .....	6
I.3. Megaplasmidul pAO1 .....	10
I.4. Metabolismul nicotinei în <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> pAO1 .....	12
II. APLICAȚII BIOTEHNOLOGICE ALE CĂII DE DEGRADARE A NICOTINEI DIN <i>ARTHROBACTER NICOTINOVORANS</i> .....	19
II.1. Aplicații biotehnologice ale nicotinei și derivaților nicotinici .....	19
II.2. Aplicații biotehnologice ale 6-hidroxinicotinei .....	21
II.3. Metode de obținere a 6-hidroxinicotinei .....	29
III. MATERIALE ȘI METODE .....	31
III.1. Tulpini utilizate și condiții de creștere .....	31
III.1.1. Tulpinile folosite în acest studiu .....	31
III.1.2. Condiții de creștere .....	32
III.2. Spectroscopia UV-VIS .....	32
III.2.1. Materiale necesare .....	33
III.2.2. Mod de lucru .....	33
III.3. Cromatografia de înaltă performanță în mediu lichid (HPLC) .....	34
III.3.1. Principiul general al cromatografiei .....	34
III.3.2. Descrierea sistemului HPLC .....	36
III.3.3. Materiale necesare .....	38
III.3.4. Mod de lucru .....	40

VI. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	41
IV.1. Stabilirea condițiilor optime de separare a 6HNic de nicotină utilizând HPLC .....	41
IV.2. Separarea cromatografică a mediului de cultură din <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> ....	43
IV.3. Dezvoltarea microorganismului <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> pe medii cu nicotină .	45
CONCLUZII .....	49
ANEXE – Cromatograme generate în cadrul acestui studiu.....	51
Cromatograme generate pentru stabilirea condițiilor de separare.....	51
BIBLIOGRAFIE .....	63

## INTRODUCERE

Boala Alzheimer este o afecțiune neurodegenerativă, progresivă și ireversibilă fiind considerată cea mai frecventă formă de demență (Hritcu et al., 2015). Se estimează ca aproximativ 24 de milioane de oameni din întreaga lume prezintă o demență de tip Alzheimer, și că 11.2 % sunt persoane de 60 ani sau chiar mai în vârstă (Mihășan et al., 2013).

Costurile necesare pentru medicamente și supraveghere sunt ridicate și încep de la 18000 de dolari pentru persoane aflate într-un stadiu incipient și pot ajunge până la 38000 de dolari pentru cei aflați într-un stadiu avansat (Borda, 2006).

Potențialul nicotinei și a intermediarilor nicotiniici rezultați din degradarea acestui alcaloid de către microorganismul *Arthrobacter nicotinovorans* de a se lega de receptorii nicotiniici pentru acetilcolină (nAChRs) a fost evaluat *in silico* prin experimente de andocare moleculară. Ligandul cu cea mai bună afinitate pentru acești receptori s-a dovedit a fi 6-hidroxi-L-nicotina (6HLNic) (Mihășan et al., 2013).

Studiile anterioare (Hrițcu et al., 2013) au arătat că 6HNic are capacitatea de a se lega de receptorii nAChRs și de a scădea nivelul stresului oxidativ în creierul șobolanilor normali (rasa Wistar) prin creșterea activității enzimelor antioxidante. Administrarea de 6HNic la șobolanii tratați cu scopolamină ameliorează tulburările de memorie spațială prin atenuarea stresului oxidativ în hipocampusul șobolanilor (Hrițcu et al., 2015).

Lucrarea aceasta face primele eforturi pentru elaborarea unei metode de producere a 6HLNic prin utilizarea directă a unei tulpini de *A. nicotinovorans* ce conține megaplasmidul pAO1. Aceasta presupune stabilirea unor condiții optime de separare a 6HLNic de nicotină din mediul de cultură a microorganismului menționat. Lucrarea a fost realizată în laboratorul de cercetare B128 a Facultății de Biologie din cadrul Universității Alexandru Ioan Cuza din Iași în perioada 01.05.2014 - 01.06.2015.





# I. CARACTERIZAREA TAXONOMICĂ ȘI FIZIOLOGICĂ A SPECIEI *ARTHROBACTER NICOTINOVORANS*

## I.1. Încadrarea taxonomică a specie *Arthrobacter nicotinovorans*

Pentru a încadra taxonomic un organism, nomenclatura și identificarea genului, respectiv a speciei au un caracter obligatoriu.

Clasificarea reprezintă aranjarea organismelor în grupuri taxonomice, conform unui set de reguli internaționale.

Nomenclatura reprezintă atribuirea numelor grupelor taxonomice conform regulilor internaționale.

Specia *Arthrobacter nicotinovorans* aparține genului *Arthrobacter*. Deși inițial s-a numit *Arthrobacter oxydans* DSM 420<sup>T</sup>, specia a fost reclasificată (Kodama și colab., 1992), și a primit numele actual ce reflectă principala caracteristică metabolică - abilitatea de a metaboliza nicotina.

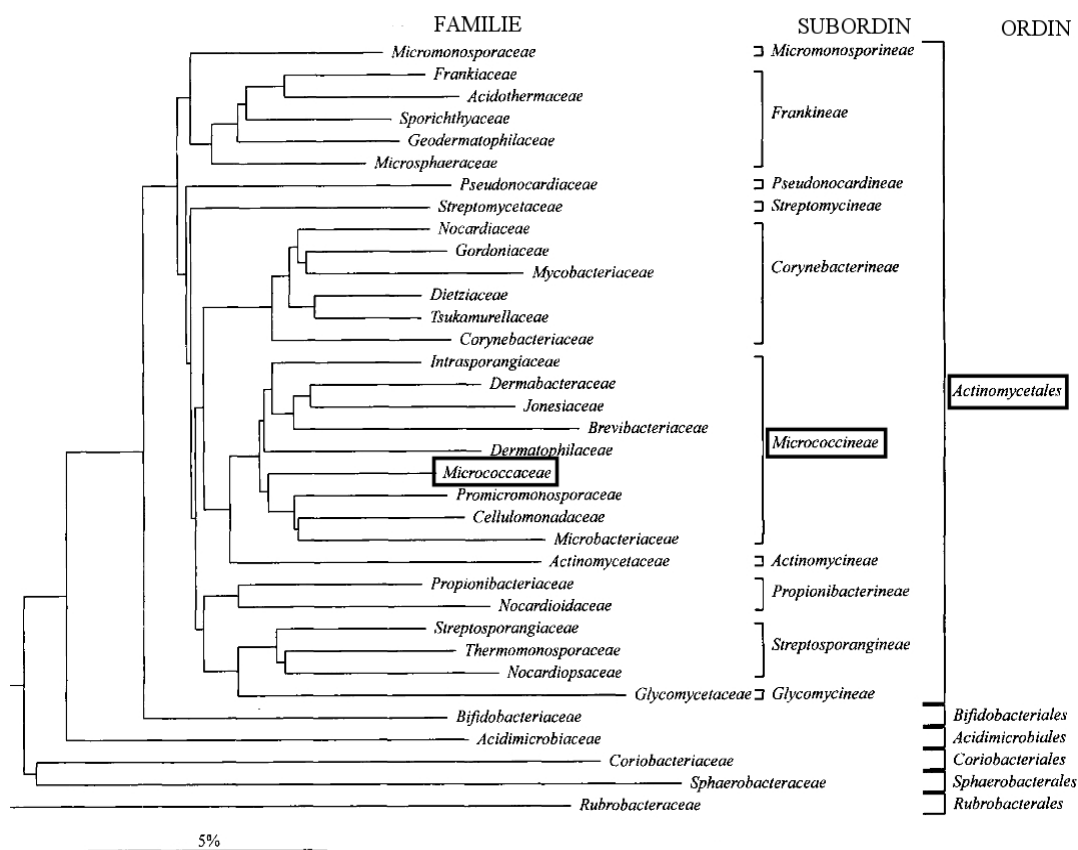
În anul 1986, Bergey a inclus acest gen în Secțiunea 15 – Bacili Gram pozitivi neregulați și nesporulanți, Clasa *Thallobacteria*, Divizia *Firmicutes*, Regn *Procariota*, clasificarea făcându-se pe baza caracterelor fiziologice și biochimice (chemo-taxonomie).

Conform Ribosomal Database Project (RDP) (Cole et al., 2009), secvențele de ARN ribozomal acumulate de la bacteriile coreiforme aerobe și facultativ aerobe ne ajută să stabilim o legătură taxonomică și filogenetică. Aceste bacterii fac parte din grupul *Arthrobacter*. În acest grup se găsesc patru subgrupuri: *Microbacterium*, *Clavibacter*, *Arthrobacter* și *Dermatophilus* (Loveland-Curtze și colab., 1999). Subgrupul *Arthrobacter* cuprinde la rândul său genurile *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Renibacterium* și *Rothia*.

Îmbinând taxonomia tradițională cu analiza secvenței ARN, genul *Arthrobacter* a fost încadrat în familia *Micrococcaceae* și în comparație cu alte genuri ale familiei, ea conține cel mai mare număr de specii. De asemenea, în această familie este încadrat și genul *Micrococcus*.

Stackebrandt et al., 1997 creează clasa *Actinobacteria* în care se încadrează subclasa *Actinobacteridae*, ordinul *Actinomycetales*, subordinul *Micrococcineae* și familia *Micrococcaceae*.

Relațiile dintre unitățile taxonomice superioare pot fi observate în figura 1 și încadrarea taxonomică a specie *Arthrobacter nicotinovorans* poate fi observată în tabel 1.



**Figura 1.** Legăturile filogenetice dintre diversele unități taxonomice din cadrul subclasei Actinobacteridae. Scala de jos reprezintă 5 substituții nucleotidice/100 nucleotide (Stackebrandt et al., 1997)

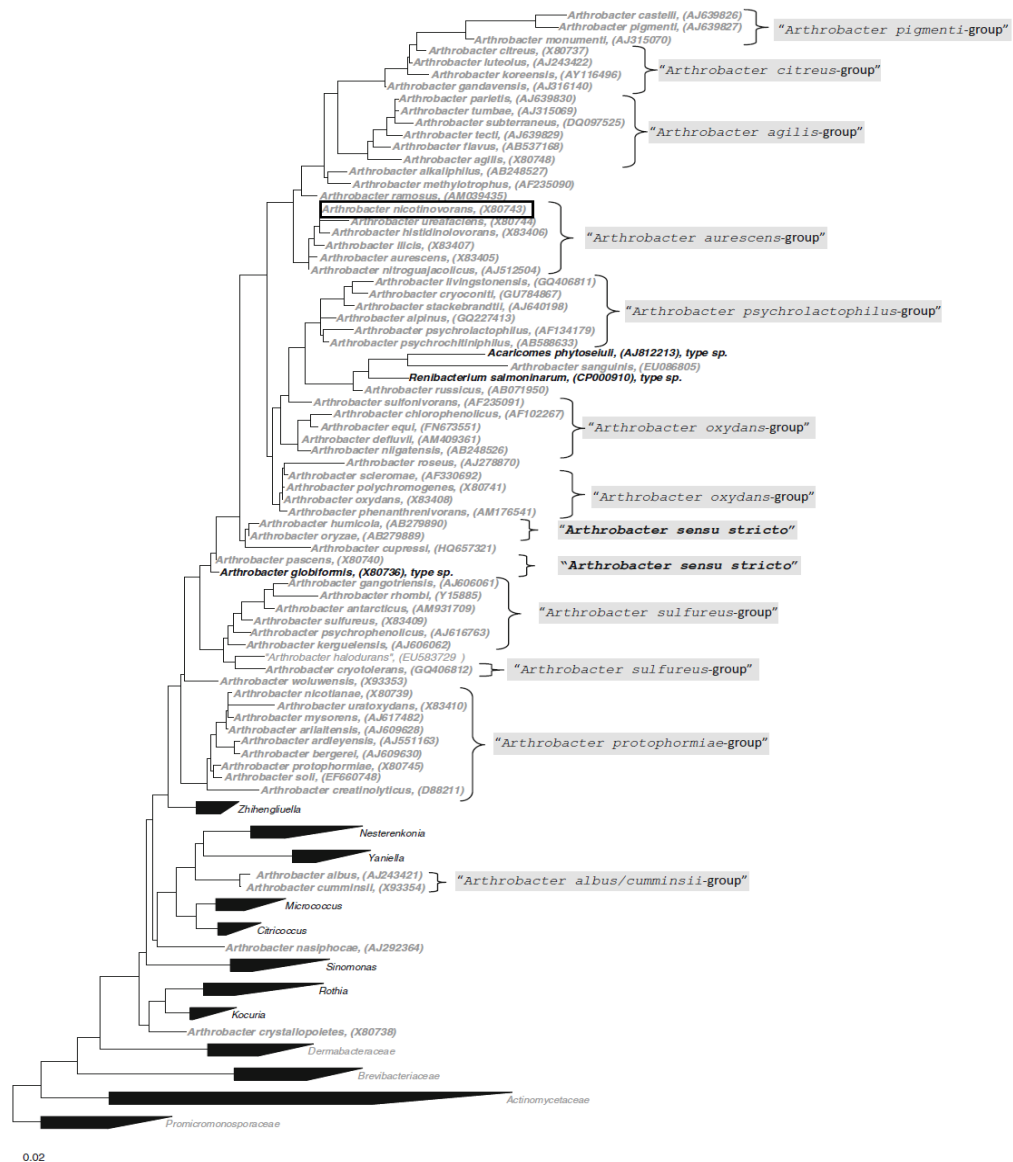
**Tabel 1.** Încadrarea taxonomică a specie *Arthrobacter nicotinovorans* în unitățile taxonomice superioare

Unitate taxonomică	Denumire
Regn	<i>Procariota</i>
Divizia	<i>Firmicutes</i>
Clasa	<i>Thallobacteria</i> (Bergey, 1986), <i>Actinobacteria</i> (Stackebrandt et al., 1997)
Subclasa	<i>Actinobacteridae</i>
Ordin	<i>Actinomycetales</i>
Subordin	<i>Micrococcineae</i>
Familie	<i>Micrococcaceae</i>
Gen	<i>Arthrobacter</i>
Specie	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>

Recent, pe baza compoziției punților interpeptidice din peptidoglican, secvențelor ARN 16S și sistemului chinonă, speciile de *Arthrobacter* au fost împărțite în 11 grupuri. După această clasificare, *Arthrobacter nicotinovorans* a fost inclus în grupul *Arthrobacter aurescens* alături de *A. aurescens*, *A. histidinovorans*, *A. ilicis*, *A. nitroguajacolicus* și *A. ureafaciens* (Busse și Wieser, 2014).

La ora actuală au fost descrise 66 de specii ce aparțin genului *Arthrobacter* și a fost împărțit în cel puțin 11 grupe pe baza secvenței ARN 16S, sistemul chinonă și structura peptidoglicanului.

Legăturile dintre speciile genului *Arthrobacter* pot fi observate în figura 2.



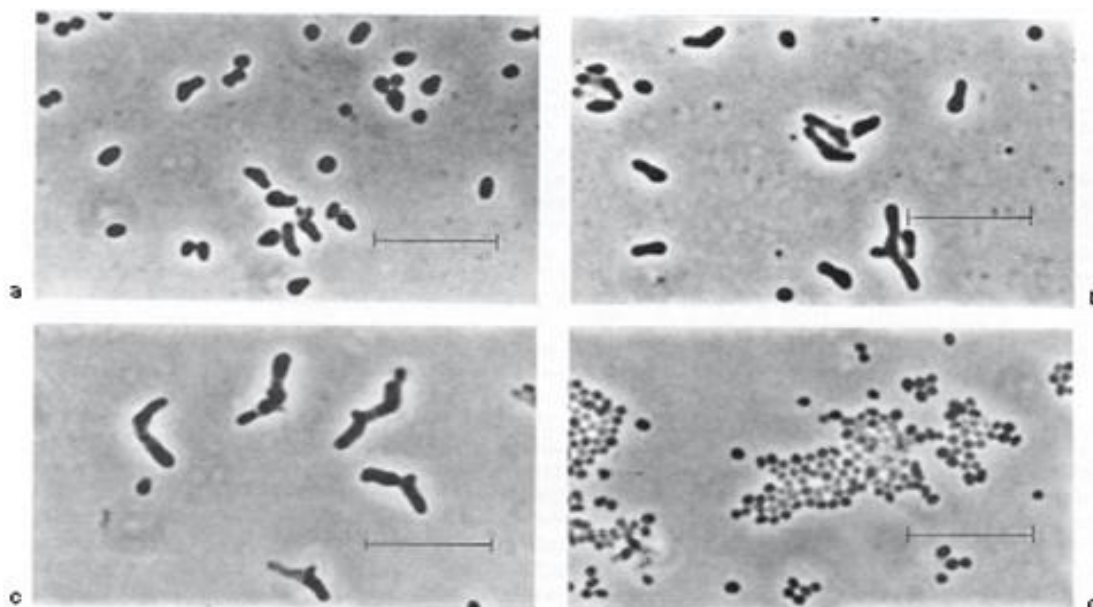
**Figura 2.** Dendrograma speciilor aparținând genului *Arthrobacter*, realizată pe baza secvenței ARN 16S. Scala de jos reprezintă 0.02 substituții nucleotidice/100 nucleotide (Busse și Wieser 2014)

## I.2. Caracteristici metabolice și morfologice ale genului *Arthrobacter*

Variabilitatea în formă și dimensiune a celulelor în ciclul celular este o importantă caracteristică a acestui gen. În faza staționară (2-7 zile), cultura este formată în mare parte din celule cocoide (~0.6-1.0  $\mu\text{m}$  în diametru). După 6 ore de la transferul pe un mediu de cultură proaspăt, celulele cocoide se umflă și produc unul sau mai multe excrescențe dând astfel naștere la bacili cu formă neregulată caracteristici fazei exponențiale (Mihășan, 2011).

Celulele bacilare se așează în formațiuni unghiulare asemenea unor V-uri. Mai poate apărea o ramificație primară, dar nu se produc micelii adevărate (ramificație secundară). Bacilii nu formează endospori, sunt imobili (rareori mobili prin intermediul unor flageli laterali) și devin mai scurți pe măsură ce cultura îmbătrânește urmând apoi ca din forma bacilară să treacă în forma cocoidă specifică fazei staționare. În ambele etape ale ciclului de creștere, bacteriile din cadrul genului *Arthrobacter* sunt Gram-pozitive dar ulterior acestea devin Gram-variabile (Keddie et al., 1986).

Acest ciclu de creștere (coco-bacil) este o trasătură distinctivă a genului dar, de asemenea, apare și în alte genuri precum *Brevibacterium* și cel puțin unii membrii din *Rhodococcus*. Variabilitatea morfologică a celulelor din ciclul celular poate fi observată în figura 3.



**Figura 3.** *Arthrobacter globiformis* (ATCC 8010) crescut pe mediu EYGA la 25 °C. Inoculul a fost alcătuit din celule cocoide; a, după 6 ore, formarea de bacili din celule cocoide; b, după 12 ore; c, după 24 ore; d, după 3 zile (scala este de 10 $\mu\text{m}$ ) (Jones și Keddie, 2006)

Ambele forme ale microorganismului (bacilară și cocoidă) sunt Gram-pozitive dar pot fi ușor decolorate. Nu formează endospori.

Chemoorganotrofic, genul *Arthrobacter* include specii aerobe deoarece metabolismul este de tip respirator și nu fermentativ, iar temperatura optimă de creștere și dezvoltare este de 25-30°C. O creștere moderată poate avea loc pe un mediu ce conține extract de drojdie și peptonă la un pH aproape neutru. Pe mediul cu peptonă, în urma metabolizării glucozei și a altor glucide se formează cantități mici sau chiar deloc de acizi. Această bacterie nu hidrolizează celuloza dar este capabilă să își sintetizeze enzime precum catalaza și deoxiribonucleaza. Unele specii, printre care și *Arthrobacter nicotinovorans* necesită biotina ca factor de creștere (Keddie et al., 1986).

Bacteriile din genul *Arthrobacter* au un conținut mare de G+C, în medie de 59-70% din ADN. *Arthrobacter nicotinovorans* are un conținut în G+C al cromozomului bacterian de 62%.

De asemenea, este demn de remarcat faptul că multe din speciile ce aparțin genului *Arthrobacter* posed caracteristici neobișnuite, cum ar fi capacitatea de a folosi un substrat toxic și de a forma un pigment neobișnuit.

Dacă ținem cont de sistemul chinonic și structura peptidoglicanului, genul *Arthrobacter* poate fi divizat în două grupe majore: un grup este caracterizat printr-un sistem chinonă cu menachinonă monosaturată [MK-8(H<sub>2</sub>) și/sau MK-9(H<sub>2</sub>) și peptidoglican de tipul A3 $\alpha$ , iar cel de-al doilea grup se caracterizează printr-un sistem chinonă cu menachinonă nesaturată (MK-8, MK-9, și/sau MK-10) și peptidoglican de tipul A4 $\alpha$  (Keddie et al., 1986).

În funcție de specie, variațiile A3 $\alpha$  și A4 $\alpha$  ale peptidoglicanului sunt caracterizate prin legăturile dintre pozițiile 3 și 4 a celor două unități peptidice ce sunt realizate de un număr diferit de punți interpeptidice. Punțile interpeptidice din peptidoglicanul de tip A3 $\alpha$  conțin numai acizi monocarboxilici și/sau glicină, iar cele din A4 $\alpha$  conține întotdeauna acid dicarboxilic și în cele mai multe tulpini conține, de asemenea, alanină (Schleifer și Kandler, 1972).

Compoziția chimică a peretelui celular reprezintă o altă caracteristică ce poate fi utilizată pentru identificarea speciilor ce aparțin genului *Arthrobacter*. De cele mai multe ori, acidul gras din componența peretelui celular este 1,3-metilpentadecanoic, iar diamino-acidul întâlnit preponderent în peptidoglican este lizina. Peptidoglicanul este de tipul Lys-Ala-Tre-Ala (Mihășan, 2011).

Membrii genului *Arthrobacter* pot fi deosebiți de alte genuri similare ce conțin lizina în peretele celular sau care prezintă un ciclu de creștere coco-bacil prin caracterele menționate în tabelul 2.

**Tabel 2.** Caracterile ce diferențiază genul *Arthrobacter* de alte genuri similare care au fie ciclul de creștere coco-bacil fie conțin lizină ca diamino-acid în peretele celular (Jones și Keddie, 2006)

Gen	Miceliu produs	Ciclu coco-bacil	Necesitatea oxigenului	Acid produs din glucoză	Perete celular		Menachinonă
					Diamino-acid	Prezența glicinei	
<i>Arthrobacter</i>	–	+	Aerobic	–	Lizină	–	MK-9 (H <sub>2</sub> ) sau MK-8 si/sau MK 9
<i>Aureobacterium terregens/Aur. flavescens</i>	–	+	Aerobic	W	Ornitină	+	MK-12 și/sau MK-13
<i>Arthrobacter simplex/A. tumescens</i>	–	+	Aerobic	–	LL-DAP	+	MK-8 (H <sub>4</sub> )
<i>Microbacterium</i>	–	–	Ambiguu	+	Lizină	+	MK-11, MK-12
<i>Renibacterium</i>	–	–	Aerobic	–	Lizină	+	MK-9
<i>Oerskovia</i>	+	–	Facultativ	+	Lizină	–	MK-9 (H <sub>4</sub> )
<i>Brevibacterium</i>	–	+	Aerobic	–	meso-DAP	–	MK-8 (H <sub>4</sub> )
<i>Rhodococcus</i>	D	D	Aerobic	–	meso-DAP	–	MK-8 (H <sub>2</sub> ) sau MK-9 (H <sub>2</sub> )

Microorganismele ce fac parte din genul *Arthrobacter* sunt caracterizate printr-o versatilitate metabolică deosebită. Acestea sunt capabile să utilizeze un număr mare de substraturi ca sursă de carbon sau azot și deci ocuparea a numeroase nișe ecologice (Mihășan, 2011).

Un număr variat de compuși toxici pentru om sau animale pot fi metabolizați de diferite specii de *Arthrobacter*. De exemplu, speciile *A. methylotrophus* și *A. sulfonivorans* au capacitatea de a metaboliza (cu ajutorul a două reductaze) dimetil-sulfona și dimetil-sulfoxidul.

O altă specie cu un metabolism interesant este *A. chlorophenolicus* deoarece are capacitatea de a metaboliza 4-clorofenol. Acest compus este unul toxic și rezultă din procesul de clorinare a apelor uzate, din degradarea erbicidelor sau din degradarea anaerobă a unor fenoli înalt-halogenati.

Recent, o specie incomplet descrisă, dar care face parte din genul *Arthrobacter*, a fost izolată în culturi pure prin selecție cu cantități mari de crom. Izolatul este capabil să crească la concentrații mari de Cr(VI) și poate să îl reducă la Cr(III) (Megharaj și colab., 2003).

Au fost descrise specii de *Arthrobacter* ce sunt capabile să metabolizeze compuși ce apar în mod natural (cianotoxine peptidice, microcistine) dar și compuși periculoși pentru mediu precum: nitroglicerolul, p-nitrofenolul, ierbicidul atrazina, trietilamina (Mihășan, 2011).

Majoritatea speciilor stabilite au fost izolate din sol și sedimente dar unele au fost recuperate și din probe clinice deși genul *Arthrobacter* nu cuprinde specii patogene. Aceste probe clinice proveneau de la indivizi cu dereglări ale sistemului imunitar, de aceea speciile au fost catalogate drept patogeni oportuniști (Wauters și colab., 2000).

*Arthrobacter nicotinovorans* este o specie frecvent întâlnită în sol. Acest microorganism este caracterizat printr-un peptidoglican de tipul A3α și printr-un sistem de menachinonă monosaturată MK-9(H<sub>2</sub>). Monozaharidele din componența peretelui celular sunt reprezentate de galactoză și glucoză. Poate hidroliza amidonul și să folosească nicotina în calitate de substrat (Keddie et al., 1986).

Dezvoltarea bacteriei pe un mediu de agar suplimentat cu nicotină, săruri minerale și extract de drojdii, este însoțită de producerea unui pigment albastru difuzabil. În cele din urmă, acest pigment se transformă într-unul roșiatic sau galben-brun pe măsură ce cultura se dezvoltă (Mihășan, 2011).

Creșterea poate avea loc și pe un mediu minimal suplimentat cu biotina, ce este alcatuit dintr-o sursă de azot (sare de amoniu) și glucoză ca sursă de carbon și de energie.

### I.3. Megaplasmidul pAO1

Un plasmid reprezintă o macromoleculă de ADN prezentă natural în unele bacterii, cărora le conferă rezistența la diferite antibiotice și metale grele. În general, plasmidele sunt alcătuite dintr-o moleculă mică (de circa 2-5 Kb) de ADN bicatenar, circular, extracromosomal, care se replică activ și independent de cromosomul bacterian. Un plasmid prezintă un situs de inițiere a replicării (origine) și unul sau mai mulți markeri de selecție. Plasmidul are un situs unic de restricție unde poate fi inserat un fragment de ADN rezultând un plasmid recombinant (Covic și Ștefănescu, 2004)

Plasmidele reprezintă principalii vectori de transport al genelor între specii. Caracteristicile metabolice deosebite precum capacitatea de a degrada compuși artificiali variați, rezistența la antibiotice sau la factori de mediu sunt amplasate pe plasmide (Mihășan, 2011).

Până în prezent, au fost studiați 20 de plasmide în speciile de *Arthrobacter*. În tabelul 3 sunt prezentate principalele caracteristici a unor plasmide din genul *Arthrobacter*.

Așa cum am precizat mai sus, specia *Arthrobacter nicotinovorans* se poate dezvolta pe un mediu mineral simplu format dintr-o sare de amoniu (sursă de azot), glucoză (sursă de carbon) și biotină. Atunci când glucoza din mediu este înlocuită cu alcaloidul nicotină, microorganismul se dezvoltă cu formarea unui pigment difuzibil, intens colorat în albastru, cunoscut sub numele de albastru-nicotină (nicotine-blue, NB). Această capacitate a bacteriei de a degrada nicotina se datorează prezenței în celulă a plasmidului pAO1, pe care se găsesc genele ce codifică enzimele implicate în această cale metabolică (Mihășan, 2011).

Plasmidul pAO1 a fost izolat pentru prima dată în 1984 de către Brandsch și Decker, iar în 2003 a fost complet secvențiat de către Igloi și Brandsch.

Dimensiunea plasmidului pAO1 este de 163127 pb dintre care, 83,2% din secvența nucleotidică codifică proteine. Au fost descrise 126 cadre de citire (ORF – open reading frames) care sunt similare cu proteine caracterizate sau cu funcția presupusă. Au fost identificate manual un număr de 39 de ORF-uri ce nu au similitudine cu secvențele cunoscute din bazele de date investigate. ORF-urile sunt distribuite egal pe cele două catene: 79 pe una și 85 pe cealaltă. Cadrele de citire au fost împărțite în funcție de rolul lor în: proteine

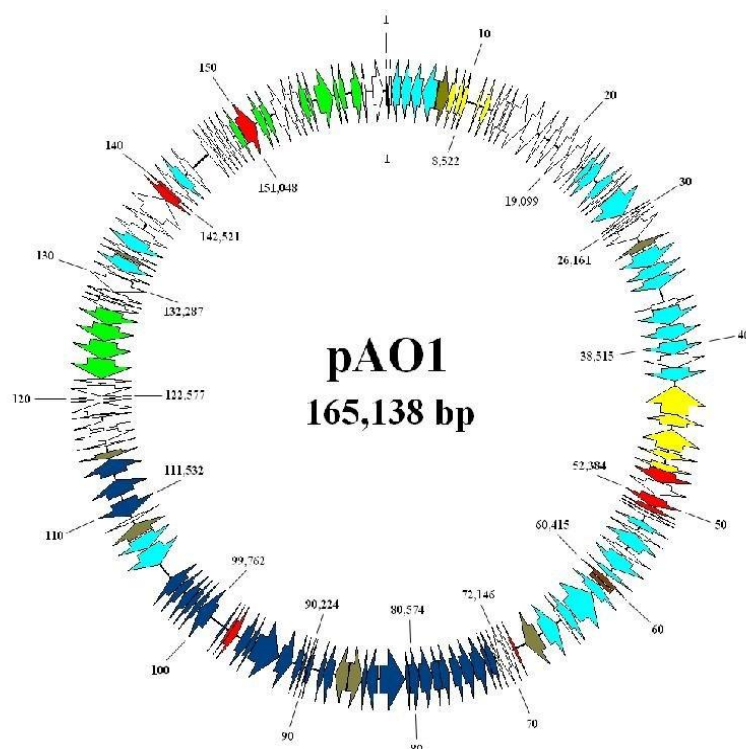


implicate în replicare, conjugare, transpoziție, rezistență la antibiotice și în utilizarea nutrienților (Mihășan, 2011).

**Tabel 3.** Plasmide descrise la diverse tulpini ce aparțin genului *Arthrobacter* (Mihășan, 2011)

Plasmid	Specia gazdă	Dimensiuni (pb)	Proteine codificate	GenBank ID	Observații
pACHL01	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	426858	554	CP001342	
pACHL02	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	158475	151	CP001343	
pASPHE301	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	190450	189	CP002380	
pASPHE302	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	94456	99	CP002381	
pFB24-104	<i>Arthrobacter</i> sp. FB24	159538	158	CP000455	
pFB24-105	<i>Arthrobacter</i> sp. FB24	115507	110	CP000456	
pFB24-136	<i>Arthrobacter</i> sp. FB24	96488	96	CP000457	
pAO1	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	165137	165	AJ507836	(Igloi și Brandsch, 2003)
pART1	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	Aprox. 5440	-	-	(Sandu et al., 2005)
pART2	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	4634	-	DQ191047	(Sandu et al., 2005)
pART3	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	5406	-	DQ191048	(Sandu et al., 2005)

Prezentarea generală a plasmidului pAO1 și amplasarea cadrelor de citire sunt prezentate în figura 4.



**Figura 4.** Cadrele de citire de pe plasmidul pAO1. Cu roșu sunt reprezentate genele implicate în transpoziție, cu galben cele implicate în replicare, cu albastru închis cele implicate în catabolismul nicotinei, albastru deschis în metabolizarea glucidelor și cele cu alb au funcție necunoscută (Brandsch și colab., date nepublicate).

#### I.4. Metabolismul nicotinei în *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1

O parte din speciile de microorganisme ce alcătuiesc comunitatea bacteriană care se găsește pe planta de tutun și în solul pe care aceasta crește, au abilitatea de a folosi L-nicotina (principalul alcaloid sintetizat de planta de tutun) ca substrat de creștere. Aceste bacterii, și-au dezvoltat strategii biochimice specifice pentru a descompune acest compus organic heterociclic (Brandsch, 2006).

Capacitatea de a folosi nicotina ca sursă de carbon, oxigen și azot nu este specifică doar speciei *Arthrobacter nicotinovorans*, ci a fost descrisă și la alte specii de bacterii precum *Pseudomonas putida*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Microsporium* și de asemenea la fungi (Mihășan, 2011).

Degradarea L-nicotinei de către aceste microorganisme se pot realiza pe 3 căi metabolice diferite: catabolismul nucleului piridinic, a nucleului pirolidonic sau prin demetilare. În cazul speciei *Arthrobacter nicotinovorans*, calea metabolică debutează cu

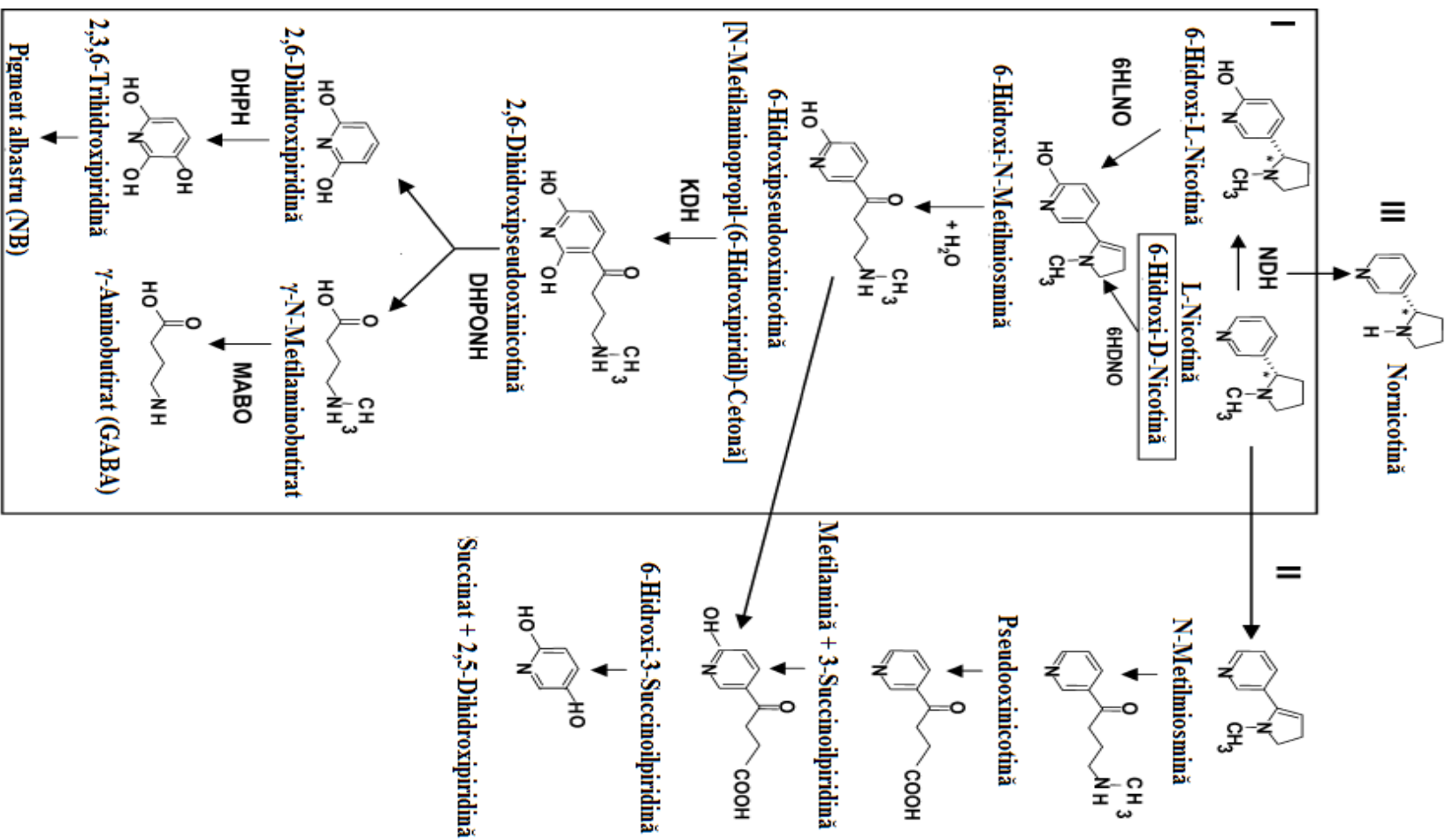
hidroxilarea nucleului piridinic. Acest fapt duce la activarea moleculei și determină realizarea din punct de vedere energetic a următoarelor etape catabolice (Mihășan, 2011). O privire de ansamblu asupra etapelor implicate în catabolismul nicotinei este reprezentată în figura 5.

Cea mai cunoscută cale metabolică de degradare a nicotinei este cea care se realizează prin catabolismul nucleului piridinic și este codificată de megaplasmidul pAO1 din *Arthrobacter nicotinovorans*. Pe plasmid sunt localizate genele responsabile de codificarea și reglarea activității enzimatică în acest proces metabolic.

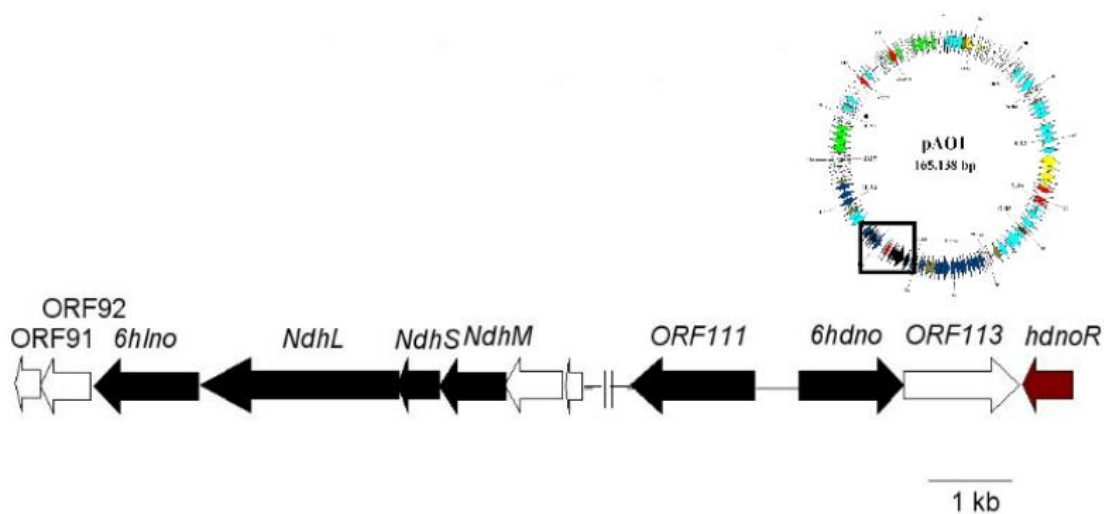
Prima etapă de degradare a nicotinei debutează cu formarea unui compus în urma hidroxilării nucleului piridinic. În 1958, Hochstein și Rittenberg reușesc să izoleze din mediul de cultură, dar și din reacții *in vitro* primul produs metabolic sub forma unor cristale albe cu punctul de topire de 120-122<sup>0</sup>C. Aceste proprietăți fizico-chimice au demonstrat că în urma hidroxilării nicotinei rezultă 6-hidroxinicotină (Hochstein și Rittenberg, 1958).

Enzima ce catalizează reacția de hidroxilare a nicotinei se numește nicotindehidrogenaza (NDH). Această enzimă este alcătuită din trei subunități: o subunitate mare de 82 kDa ce conține cofactorul molibdenic, una medie de 30 kDa cu FAD legat ne-covalent și una mică de 15 kDa cu 2 clusteri 2Fe-S. Masa moleculară în forma nativă a complexului este de 120 kDa ceea ce corespunde unei structuri  $(\alpha\beta\gamma)_2$  (Brandsch, 2006). În figura 6 se poate observa direcția celor 3 gene ce codifică enzima NDH.

În următoarea etapă a căii metabolice, inelul pirolidinic este supus acțiunii enzimei 6-hidroxinicotin-oxidaza (6HLNO și 6HDNO) rezultând astfel 6-hidroxi-metil-miosmină. Acest compus este instabil și reacționează spontan cu apa formând 6-hidroxi-pseudo-oxinicotină [metilaminopropil-(6-hidroxi-piridil)-cetonă] (Mihășan, 2011).



**Figura 5.** Etape cunoscute în calea de degradare a nicotinei. I, de către microorganismul *Arthrobacter nicotinovorans*; II, de către specii de *Pseudomonas*; III, de-metilare realizată de unele bacterii și fungi rezultând nornicotină. NDH, nicotin-dehidrogenază; 6HLNO și 6HDNO, 6-hidroxi-L- respectiv 6-hidroxi-D-nicotin oxidaze; KDH, ceton-dehidrogenază; DHPONH, 2,6-dihidroxipseudooxicotin-hidrolaza; MABO, metilaminobutirat-oxidaza (Brandsch, 2006)



**Figura 6.** Modul de aranjare și localizarea genelor implicate în codificarea enzimei NDH în cadrul plasmidului pAO1 (Mihășan, 2011)

Stereo-specificitatea reprezintă un aspect important al acestei reacții. Planta de tutun produce L-nicotină și cantități mici de D-nicotină. Racemizarea poate avea loc în timpul descompunerii plantei și de asemenea prin încălzire. Enzima NDH nu manifestă stereo-specificitate deoarece poate converti atât L- cât și D-nicotina în 6-hidroxi-L-nicotină respectiv 6-hidroxi-D-nicotină. În a doua etapă a căii metabolice, există 2 enzime ce catalizează oxidarea celor 2 izomeri (6HLNO – acționează asupra izomerului L și respectiv 6HDNO – acționează asupra izomerului D).

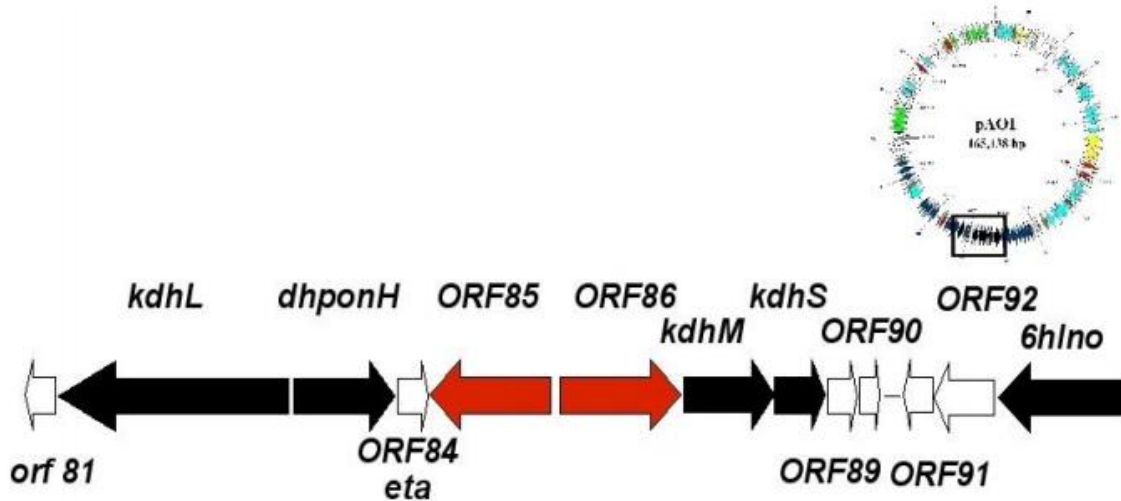
Enzima 6HLNO este o flavoproteină dimeră cu masa de 46 kDa ce face parte din clasa amin-oxidazelor, iar 6HDNO este o enzimă monomer ce conține un FAD legat covalent de un rest de histidină. Modul de legare a cofactorului reprezintă diferența din HLNO și HDNO (Mihășan, 2011).

Gena responsabilă de codificarea enzimei 6HLNO este plasată alături de cele 3 gene pentru NDH și având aceeași direcție alcătuind aparent un operon. Gena ce codifică enzima HDNO este plasată pe un operon diferit de cel al HLNO, având direcția opusă (Mihășan, 2011).

După acțiunea celor 2 enzime, 6-hidroxi-pseudo-oxinicotina este supusă unei noi hidroxilări la atomul C2. Această reacție este catalizată de o enzimă cu numele sistemic 6-hidroxi-pseudo-oxinicotin:acceptor oxido-reductază (hidroxilantă) și este cunoscută ca ceton-dehidrogenaza (KDH). KDH este o enzimă trimeră alcătuită dintr-o subunitate mică de 17

kDa care conține 2 clusteri Fe-S, o subunitate medie de 30 kDa cu FAD și o subunitate mare de 85 kDa conținând cofactorul molibdenic. În urma acestei hidroxilări, se formează 2,6-dihidroxi-pseudo-oxinicotina (Brandsch, 2006; Mihășan, 2011).

Modul de aranjare a genelor responsabile de cele 3 subunități ale KDH este complet diferit față de celelalte enzime. Subunitatea mare (*kdhL*) are o direcție opusă și se află la o distanță de aproximativ 4 kb față de celelalte 2 subunități (*kdhM* și *kdhS*). În figura 7 este reprezentată distribuția genelor responsabile de KDH pe megaplasmidul pAO1.



**Figura 7.** Aranjarea genelor ce codifică cele 3 subunități a enzimei KDH și amplasarea lor pe megaplasmidul pAO1 (Mihășan, 2011)

Un pas important în catabolismul nicotinei este reprezentat de scindarea 2,6-dihidroxi-pseudo-oxinicotinei în 2,6-dihidroxipiridină și  $\gamma$ -N-metilaminobutirat sub acțiunea enzimei 2,6-dihidroxi-pseudo-oxinicotin-hidroxilaza (DHPONH). Mai departe, 2,6-dihidroxipiridina este supusă hidroxilării, sub acțiunea unei monooxigenaze FAD-dependență formându-se astfel 2,3,6-trihidroxipiridina (pigmentul albastru) care este expulzat în mediul de cultură (Brandsch, 2006). Al doilea produs rezultat, este integrat în calea acizilor tricarboxilici în două moduri.

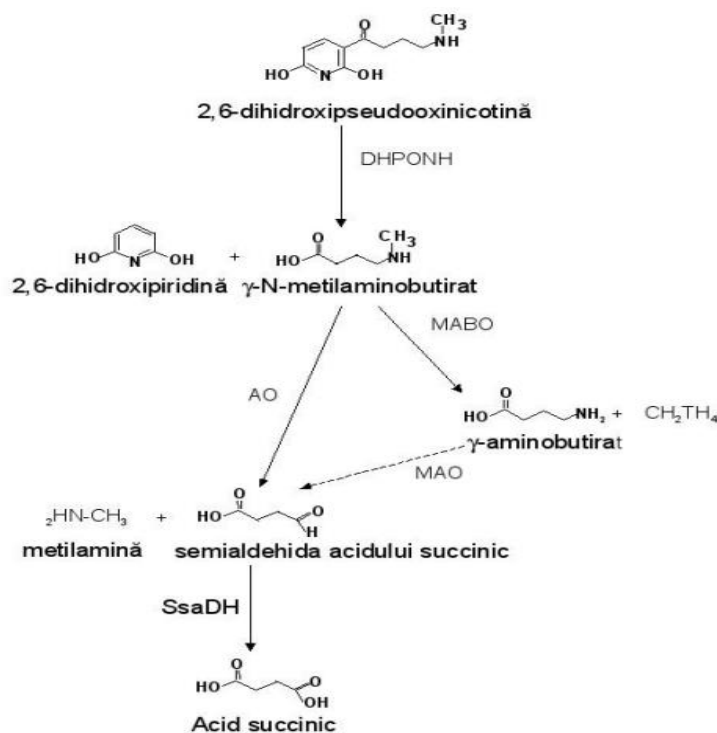
O primă modalitate de integrare este prin dezaminarea oxidativă a  $\gamma$ -N-metilaminobutiric formându-se astfel metilamină și acid  $\gamma$ -aminobutiric (GABA). Reacția este catalizată de o enzimă cu o înaltă specificitate de substrat ( $K_m=140 \mu\text{M}$  și  $K_{cat}=800 \text{ s}^{-1}$ ) numită metil- $\gamma$ -N-aminobutirat oxidaza demetilantă (MABO). Această enzimă are masa moleculară de 90 kDa și conține FAD în calitate de co-factor (Chiribau și colab., 2006).

Într-o cale alternativă, acidul  $\gamma$ -N-metilaminobutiric este supus acțiunii mono-amin-oxidazei (MAO), produșii de reacție fiind semialdehida acidului succinic și metilamina. De asemenea, enzima este capabilă să utilizeze și acidul  $\gamma$ -aminobutiric, însă cu o eficiență mai mică față de MABO (Chiribau și colab., 2006).

Cele două enzime, MABO și MAO, concurează pentru același substrat, MABO fiind de aproximativ 10 ori mai activă decât MAO. Competiția dintre cele două enzime a pusă în evidență *in vitro* (Chiribau și colab., 2006) dar nu și *in vivo*. În urma marcării radioactiv a nicotinei, s-a observat că în mediu se acumulează metilamină, ceea ce ar indica că *in vivo* predomină a doua cale (Mihășan, 2011).

S-a demonstrat că metabolizarea acidului  $\gamma$ -aminobutiric nu este dependentă de prezența megaplasmidului pAO1 deoarece celule ce nu posedă acest plasmid pot folosi acest produs ca unică sursă de C și N (Chiribau et al., 2006).

Semialdehida acidului succinic este convertită în acid succinic. Reacția este catalizată de o dehidrogenază a semialhidei acidului succinic (SaD). Această enzimă poate utiliza atât  $\text{NAD}^+$  cât și  $\text{NADP}^+$ , însă cu  $\text{NAD}^+$  reacția este de 25 de ori mai lentă. Acidul succinic poate urma calea acizilor tricarboxilici completând astfel catabolismul fragmentului de pirolidină a nicotinei (Chiribau și colab., 2006). În figura 8 sunt prezentate reacțiile în clivarea și degradarea catenei laterale.



**Figura 8.** Schema reacțiilor implicate în clivarea și degradarea catenei laterale (Mihășan, 2011)





## II. APLICAȚII BIOTEHNOLOGICE ALE CĂII DE DEGRADARE A NICOTINEI DIN *ARTHROBACTER NICOTINOVORANS*

### II.1. Aplicații biotehnologice ale nicotinei și derivaților nicotinici

Tutunul (*Nicotiana tabacum*, Familia *Solanaceae*) este cultivat în special în Brazilia, China, Cuba, India și SUA. La nivel global se estimează o producție anuală de 6.7 milioane de tone de tutun, China fiind cel mai mare producător de tutun (39.6%), urmată de India (8.3%), Brazilia (7.0%) și SUA (4.6%). Cele mai mari țări consumatoare de tutun din lume sunt China, SUA și India. Se preconizează că industria tutunului ar produce 3 00 274 de tone deșeurilor de nicotină în fiecare an. O parte sau toată frunza de tutun a fost folosită ca materie primă pentru produsele din tutun precum țigări, trabucuri și tutun de mestecat (Gurusamy și Natarajan, 2013).

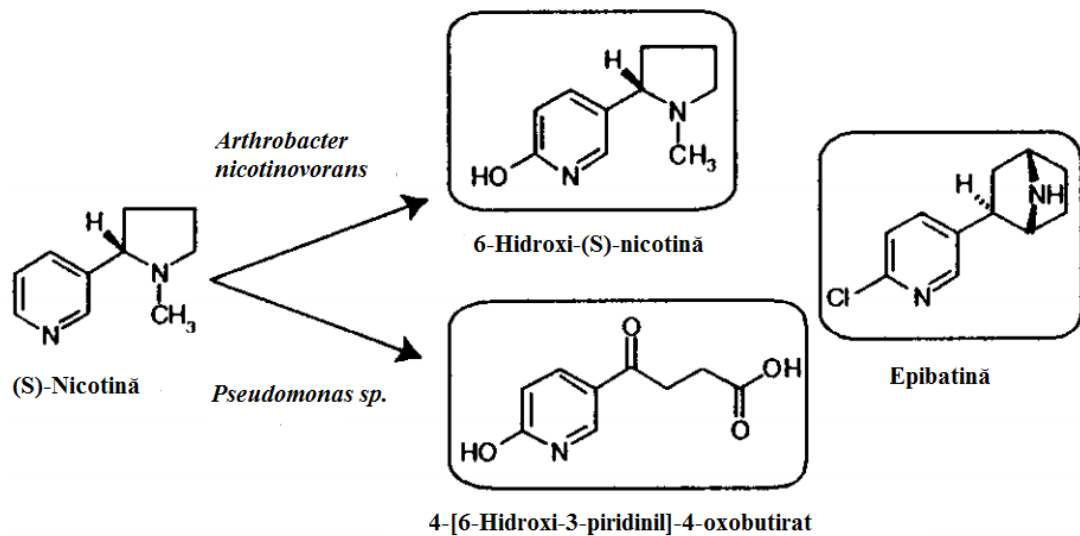
Datorită utilizării crescute a produselor din tutun, industria a creat deșeurile solide și lichide din tutun ce conțin concentrații mari de nicotină. Agenția pentru protecția mediului (APM) a clasificat aceste deșeurile de tutun (sub formă de pulbere non-reciclabilă) ca fiind produse chimice toxice eliberate în mediu (Toxic Release Inventory – TRI). Când aceste deșeurile de tutun sunt eliberate pe pământ fără depozitarea și prelucrarea adecvată, nicotina se dizolvă ușor în apă ceea ce duce la contaminarea pânzei de apă freatică. Prin urmare, apa contaminată cu nicotină perturbă echilibrul ecologic al solului (Gurusamy și Natarajan, 2013).

Nicotina este un compus heterociclic, alcătuit dintr-un inel piridinic și un fragment pirolidinic. În stare pură, compusul este un lichid de culoare galben-pal sau maro-închis și atunci când este încălzit capătă un miros de pește. Formula chimică a nicotinei este  $C_{10}H_{14}N_2$ , iar masa moleculară este de 162.234 grame. Alcaloidul are punctul de topire de  $-79^{\circ}C$  și cel de fierbere de  $247^{\circ}C$ . Nicotina reprezintă până la 2-8% din masa uscată a frunzelor de tutun (Gurusamy și Natarajan, 2013).

Biotransformarea sau biocataliza implică utilizarea de microorganisme pentru a cataliza conversia unui metabolit în altul. Aceste transformări pot fi catalizate de celule microbiene, extracte celulare sau enzime. Biotransformarea este un instrument de viitor, utilizat la producerea în masă a unor compuși chimici necesari pentru sinteza altor substanțe precum cele farmaceutice sau ingrediente alimentare și agro-chimice în industrie (Gurusamy și Natarajan, 2013).

Nicotina este utilizată ca materie primă pentru producerea biocatalitică a unor piridine funcționalizate din surse regenerabile. Acești compuși sunt precursori în sinteza medicamentelor precum analogi ai epibatidinei, un analgezic extrem de eficient produs de o broasca tropicală numită *Epipedobates tricolor* (Spande și colab., 1992).

Deși a fost mult timp cunoscut faptul că microorganismele formează o mare varietate de metaboliți din nicotină atunci când folosesc acest alcaloid drept sursă de carbon și azot, acești metaboliți nu au fost utilizați ca precursori pentru sinteza chimică a noilor analogi ai nicotinei (Figura 9) (Schmid și colab., 2001)



**Figura 9.** Procese biocatalitice asupra nicotinei ce duc la obținerea de derivați asemănători cu epibatina (Schmid et al., 2001)

Cea mai ușoară modalitate de biotransformare a fost utilizată pentru a converti nicotina toxică în compuși valoroși precum 6-hidroxi-3-succinoil piridină (HSP) și 2,5-dihidroxipiridină (DHP).

Biotransformarea nicotinei și obținerea derivaților nicotinici este utilizată pe scară largă în tratamente împotriva cancerului, împotriva malariei, în producerea de medicamente (analgice), în tratamentul boalei Parkinson, în hipertensiune arterială și tulburări ale sistemului nervos central (Gurusamy și Natarajan, 2013).

Metaboliții intermediari ai nicotinei sunt precursori în sinteza de medicamente precum analogi ai epibatinei, un analgezic extrem de eficient, care este folosit în industria farmaceutică (Spande et al., 1992)

Intermediarii hidroxilați de piridină sunt folosiți ca precursori pentru sinteza de medicamente și insecticide prin metode chimice (Wang și colab., 2012). Metaboliții biologici activi, 2,5- sau 3,5- piridine disubstituite, sunt produși din 6HLN și HSP și sunt utilizați pentru sinteza insecticidului imidacloprid (Gurusamy și Natarajan, 2013).

Intermediarul metabolic 2,5-DHP, poate fi utilizat ca material inițial pentru sinteza chimică a unui precursor universal și anume acidul levulinic. Acest precursor este folosit pentru a sintetiza regulatori de creștere a plantelor, erbicide, medicamente utilizate în terapii de cancer și în sinteza de porfirine, cum ar fi hem și clorofilă (Nakano și colab., 1999).

Numeroase studii s-au concentrat în principal pe efectele compușilor rezultați în urma metabolismului nicotinei în celulele mamiferelor, datorită contribuției lor potențiale la efectele neurofarmacologice rezultate din expunerea la nicotină.

În celulele mamiferelor, nicotina este rapid metabolizată în ficat sub forma a șase metaboliți primari (nornicotina, cotinina, 2-hidroxicotina, N-oxid nicotina, glucuronid-nicotina și ioni izometonini). Calea predominantă este cea în care se formează cotinina (în organismul uman, 70-80% din nicotină este metabolizată în cotinină) care poate avea o anumită relevanță în diverse efecte neurobiologice ale fumatului ca ligand a nicotinei de receptori acetilcolinici (nAChRs) (Hrițcu și colab., 2013).

Mai mult decât atât, există indicii că cotinina este o substanță farmacologic activă. Utilizând analiza radio-cromatografică de înaltă performanță, nicotina și trei metaboliți nicotinici (cotinina, nornicotina și norcotinina) au fost identificați în creier împreună cu un al patrulea metabolit necunoscut. Prin urmare, cotinina este capabilă să traverseze bariera hemato-encefalică și de a accesa sistemul nervos central. Deci, prezența sa în creier după administrarea periferică a nicotinei indică faptul că cotinina poate contribui la efectele neurofarmacologice a nicotinei (Hrițcu și colab., 2013)

## **II.2. Aplicații biotehnologice ale 6-hidroxicotinei**

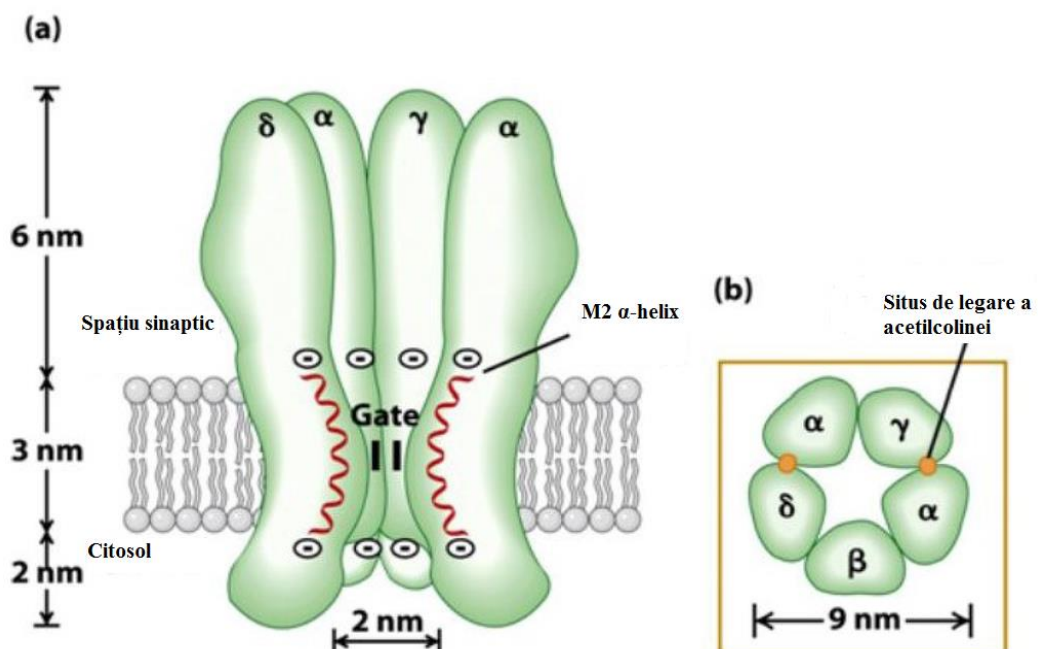
Într-un studiu recent (Hrițcu și colab., 2009), s-a raportat că administrarea cronică de nicotină poate duce la deteriorarea memoriei spațiale prin creșterea stresului oxidativ din creier. Aceste efecte pot duce la reducerea activității enzimelor antioxidante, creșterea producției de lipide peroxidate și de specii de oxigen reactive și la fragmentarea ADN-ului. Pe de altă parte, numeroase studii indică faptul că nicotina și derivații săi nu provoacă efecte genotoxice și că alterările ADN-ului nu sunt cauzate de nicotină (Hrițcu et al., 2013).

Toate aceste rezultate pot indica faptul că impactul nicotinei și a metaboliților nicotinici asupra funcțiilor creierului nu este neglijabil. Astfel, este important să obținem mai multe informații cu privire la efectele biologice a derivaților nicotinici din celulele bacteriene sau a mamiferelor în scopul de a gestiona posibile anomalii neurologice în unele afecțiuni neurodegenerative (Hrițcu et al., 2013).

Receptorul nAChR este o glico-proteină de dimensiuni mari (290 kDa), alcătuită dintr-un inel cu cinci subunități omoloage. Fiecare subunitate cuprinde trei domenii: un domeniu intracelular mic, un domeniu transmembranar la nivelul căruia se găsește porul și un domeniu extracelular mare unde are loc interacțiunea cu ligandul (Mihășan și colab., 2013).

Acești receptori se găsesc într-o gamă largă de diverse subtipuri. Această varietate este dată de combinațiile unice ale unor subunități ( $\alpha 1$ - $\alpha 10$ ,  $\beta 1$ - $\beta 4$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) similare dar diferite din punct de vedere genetic. Într-o moleculă de nAChR, există cinci situsuri de legare a nicotinei localizate în domeniul extracelular, la interfața a două subunități diferite (Mihășan și colab., 2013).

Când un neurotransmițător se atașează de situsul localizat în domeniul extracelular, este declanșată deschiderea rapidă a canalului de ioni (a porului) din domeniul transmembranar. Canalul transmembranar este format din patru segmente membranare  $\alpha$  helicoidale (M1-M4) (Figura 10) (Lebbe și colab., 2014).



**Figura 10.** Reprezentarea schematică a unui receptor nAChR arătând (a) încorporarea în membrană, spațiul sinaptic, citosolul precum și segmentul membranar M2  $\alpha$  helicoidal și (b) situsurile de legare a acetilcolinei. În ambele situații este inclusă dimensiunea (Lebbe și colab., 2014)

Deși nu există structuri cristaline de înaltă rezoluție a receptorilor nAChRs, identificarea modului de legare a unor substanțe precum 6-hidroxinicotinei (6HNic) sau a nicotinei de acești receptori poate fi urmărită utilizând structuri cristaline similare. Molecula folosită ca model, este reprezentată de o proteină de legare a acetilcolinei (AChBP) localizată în celulele gliale ale melcului de apă dulce, *Lymnaea stagnalis* (Hrițcu et al., 2013).

Această proteină a fost aleasă și utilizată într-o serie de experimente de legare *in silico*, cu rolul de a furniza detalii cu privire la posibilul mecanism de acțiune a 6HNic (Mihășan et al., 2013).

Pentru a putea lua în considerare dacă un compus este un posibil agent terapeutic pentru boala Alzheimer (AD), acesta trebuie să aibă unele efecte asemănătoare cu cele ale nicotinei mai ales atunci când vine vorba de legarea de receptorii nAChRs și proprietăți antioxidante (Mihășan și colab., 2013).

Potențialul metaboliților nicotinic rezultați din calea de degradare a microorganismului *Arthrobacter nicotinovorans* de a se lega de receptorii nAChRs a fost evaluat *in silico* prin experimente de atașare. Primul ligand atașat de situsul de legare a receptorilor a fost L-nicotina. Orientarea obținută computațional a L-nicotinei cu cea determinată experimental indică faptul că metoda de atașare utilizată este eficientă. Ligandul cu cea mai bună afinitate pentru situsul de legare a receptorilor nAChBP s-a dovedit a fi 6HLNic (Tabel 4), primul intermediar metabolic (Mihășan et al., 2013).

Rezultatele teoretice de atașare a 6HNic au fost similare cu cele observate experimental în cazul L-nicotinei. Pe lângă faptul că acest compus s-ar potrivi în situsul de legare, energia interacțiunii dintre 6HNic și receptori este mai mare decât energia exercitată de nicotină (-6.17 pentru nicotină și -6.66 pentru 6HNic). Acest lucru se explică prin formarea unei legături de hidrogen între gruparea hidroxil a 6HNic și Tyr185 ce aparține receptorilor nAChBP (Figura 11) (Mihășan și colab., 2013).

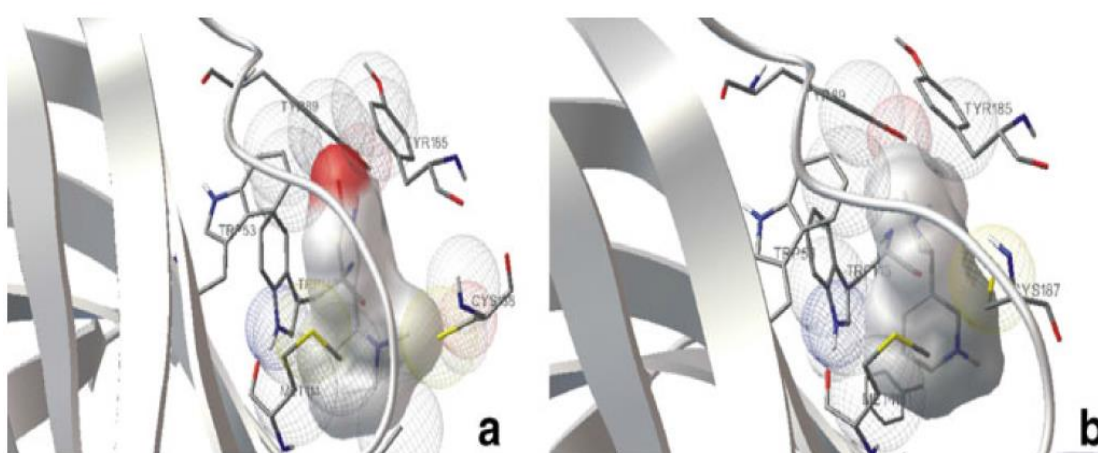
Prin utilizarea unor metode computaționale, s-a observat că 6HNic este un ligand mai eficient pentru receptorii nAChRs comparativ cu nicotina (Mihășan și colab., 2013).

Studiile anterioare (Hrițcu și colab., 2013) au arătat că 6HNic are capacitatea de a se lega de receptorii nicotinic pentru acetilcolină și de a scădea nivelul stresului oxidativ în creier la șobolanii normali (rasa Wistar). Șobolanii au fost supuși unui tratament cronic de 6HNic (doze de 0.3 mg/kg, intraperitoneal timp de șapte zile consecutive) și performanțele lor cognitive au fost evaluate cu ajutorul labirintelor comportamentale specifice pentru testarea memoriei de scurtă durată (labirintul Y) și de lungă durată și învățare (labirintul cu brațe radiale).

**Tabel 4.** Rezultate privind afinitatea liganzilor pentru receptorii AchBP (Mihășan et al., 2013)

Ligand	Energia de legare	Eficiența ligandului
L-nicotină	-6.17	-0.51
	-6.17	-0.51
	-6.12	-0.51
D-nicotină	-6.42	-0.54
	-6.21	-0.52
	-6.12	-0.51
6-hidroxi-L-nicotină (6HLNic)	-6.66	-0.51
	-6.61	-0.51
	-6.57	-0.51
6-hidroxi-D-nicotină (6HDNic)	-6.51	-0.5
	-6.45	-0.5
	-6.13	-0.47
2,6-dihidroxi-N-metilmiosmină	-5.23	-0.37
	-5.04	-0.36
	-4.85	-0.35
2,6-dihidroxi-piridină	-5.23	-0.37
	-5.04	-0.36
	-4.85	-0.35
2,3,5-trihidroxi-piridină*	nd	nd

\*nu a putut fi atașat în situsul de legare



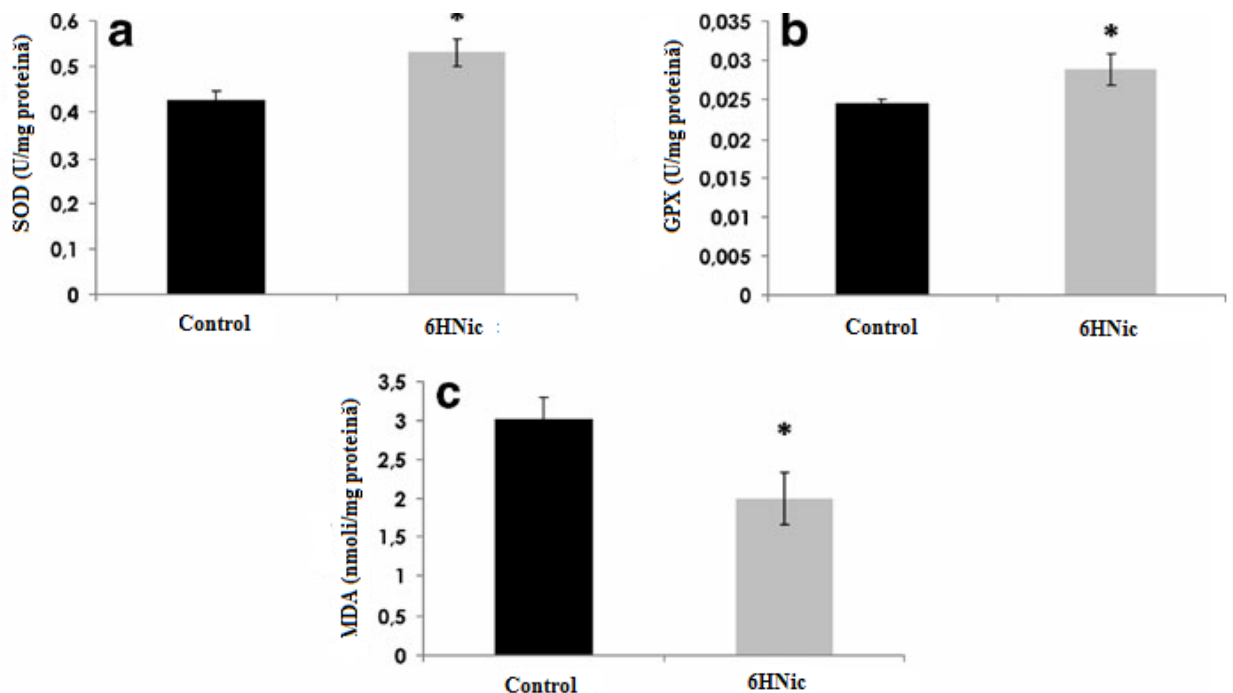
**Figura 11.** Poziția de legare a 6HLNic (a) și a nicotinei (b) așa cum este prezentat prin experimente de atașare *in silico*. Tyr185 formează o legătură de hidrogen în plus (marcat cu roșu) cu 6HLNic (Hrițcu et al., 2013)

Mai mult decât atât, 6HNic crește activitatea enzimelor antioxidante (superoxid dismutaza și glutatión peroxidaza) și scade producția de lipide peroxidate (malondialdehida) sugerând efecte antioxidante (Figura 12) (Hrițcu și colab., 2013).

Superoxid dismutaza (SOD) catalizează conversia speciilor active de oxigen în apă oxigenată ( $H_2O_2$ ) și oxigen. În condiții fiziologice, radicalii superoxid sunt produși în principal din lanțul respirator dar ei pot fi, de asemenea, sintetizați de microglia activă. Studiile recente (Hrițcu și colab., 2013) sprijină ipoteza că creșterea activității superoxid dismutazei ar putea duce la niveluri scăzute de  $H_2O_2$  intracelular.

În mod similar, activitatea specifică a glutatión peroxidazei (GPX) a fost crescută în lobul temporal la toți șobolanii tratați cu 6HNic (Hrițcu et al., 2013).

Parametrii de peroxidare lipidică pot arăta modificările patologice din creier deoarece peroxidarea lipidelor este unul din factorii determinanți ai stresului oxidativ indus de speciile reactive de oxigen. La toți șobolanii tratați cu 6HNic, s-a constatat o scădere semnificativă a nivelului de peroxidare a lipidelor (scăderea semnificativă a nivelului de malonaldehidă - MDA) (Hrițcu și colab., 2013).



**Figura 12.** Efectele administrării 6-hidroxinicotinei (0.3 mg/kg de masă corporală, intraperitoneal) asupra activității superoxid dismutazei (SOD) (a), glutatión peroxidazei (GPX) (b) și asupra nivelurilor de malonaldehidă (MDA) (c) din lobul temporal a șobolanilor (Hrițcu și colab., 2013)

Boala Alzheimer (AD) este o afecțiune neurodegenerativă, progresivă și reprezintă cea mai frecventă formă de demență. Se estimează că aproximativ 24 de milioane de oameni din întreaga lume au demență de tip Alzheimer. S-a demonstrat că natura progresivă de neurodegenerare în boala Alzheimer duce la insuficiență sinaptică și leziuni neuronale în ariile corticale ale creierului (Hritcu și colab., 2015; Mihașan și colab., 2013).

Caracterizat printr-o deteriorare progresivă a funcțiilor cognitive și noncognitive, AD este asociată cu trei schimbări cardinale în creier: formarea placilor extra- și intracelulare de peptide  $\beta$ -amiloidice, formarea ghemurilor intracelulare de proteine tau hiperfosforilate și pierderea neuronilor colinergici și o scădere pronunțată a nivelului de acetilcolină (Mihașan și colab., 2013).

Formarea memoriei spațiale a fost evaluată după administrarea intraperitoneală de 6HNic (0.3 mg/kg) la șobolanii tratați cu scopolamină (0.7 mg/kg). Prin urmare, administrarea de scopolamină provoacă tulburări de memorie. Scopolamina este un alcaloid care prezintă antagonism competitiv față de receptorii muscarinici ai acetilcolinei (mAChRs) prin interferarea cu transmisia colinergică în sistemul nervos central. De aceea, administrarea de scopolamină la animale este folosită ca un model experimental al deteriorării cognitive și a tulburărilor de memorie în cazul bolii Alzheimer. Acest model animal este frecvent utilizat pentru a căuta medicamente care au o posibilă valoare terapeutică la pacienții cu demență de tip Alzheimer (Hritcu și colab., 2015).

În studiile recente (Hrițcu et al., 2013, 2015), au fost investigate efectele 6HNic asupra progresiei patologiei asemănătoare bolii Alzheimer, în special din punctul de vedere al deficitului de memorie și efectele stresului oxidativ dar și al mecanismului ce stă la baza efectelor benefice asupra bolii Alzheimer indusă de scopolamină în modelul animal (șobolani din raza Wistar).

Cu ajutorul labirintelor comportamentale Y și cu brațe radiale, s-a testat memoria de scurtă și de lungă durată precum și memoria spațială, procese dependente de hipocamp și afectate în boala Alzheimer. Hipocampul este bogat în receptori nicotinici și activarea acestor receptori pot declanșa o varietate de procese celulare și moleculare care pot contribui la efectele produse de 6HNic asupra testelor în care este implicat hipocampul (Hrițcu et al., 2015).

Formarea hipocampului este implicată în procesul de învățare și memorie și s-a raportat ca hipocampul joacă un rol important în prelucrarea și reamintirea informațiilor spațiale și contextuale (Hrițcu et al., 2015).

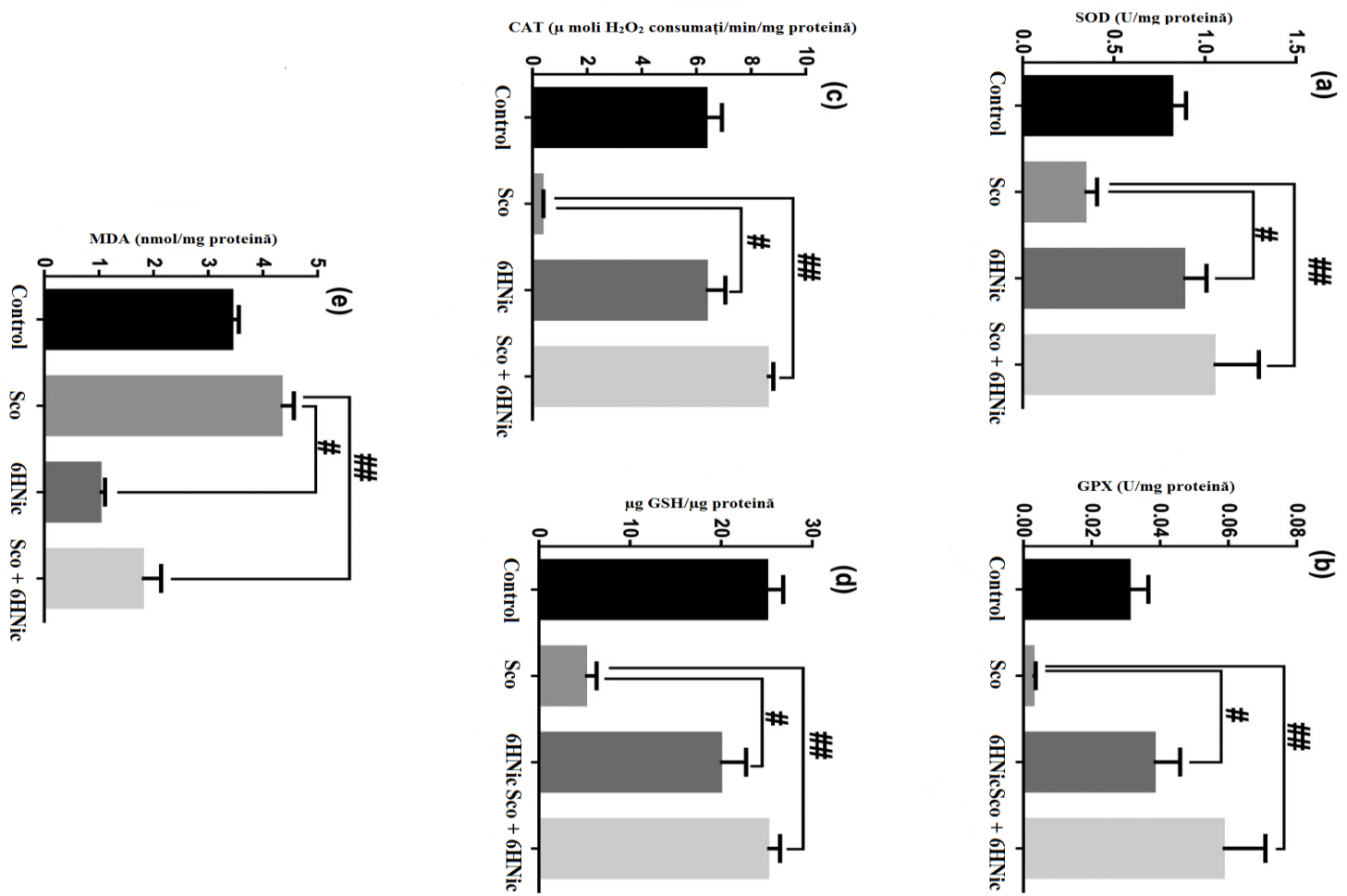


Labirintul Y este un test specific și sensibil a memoriei de recunoaștere spațială la rozătoare. Testul se bazează pe o tendință înnăscută a șobolanilor de a explora un mediu nou. Labirintul Y a fost folosit pentru evaluarea memoriei și partea specifică a creierului implicată în acest test include hipocampusul (Hrițcu et al., 2015).

Într-un studiu recent (Hrițcu et al., 2015), s-a evaluat dacă tulburările de memorie induse de scopolamină sunt legate de modificarea indicilor stresului oxidativ. La șobolanii tratați cu scopolamină s-a observat o reducere a activității specifice a SOD, GPX și catalazei (CAT) împreună cu un conținut scăzut de glutathion redus (GSH) și un nivel crescut de MDA în omogenatele hipocampice (Figura 13).

Scăderea activității specifice a SOD și CAT determină creșterea nivelului de MDA în omogenatele hipocampice sugerând faptul că aceste evenimente sunt necesare pentru a curăța radicalii superoxide induși de scopolamină. Tratarea cu 6HNic a amneziei induse de scopolamină la șobolani a determinat o scădere semnificativă a nivelului de MDA și a dus la restaurarea activității specifice a celor două enzime (SOD și CAT) și, de asemenea, a conținutului total de GSH redus în omogenatele hipocampice (Hrițcu și colab., 2015).

Rezultatele testelor realizate pe șobolani au indicat că 6HNic are activitate antioxidantă puternică prin inactivarea speciilor reactive de oxigen, exercită un efect de protecție împotriva stresului oxidativ indus de scopolamină și ajută la îmbunătățirea funcției de memorie (Hrițcu și colab., 2015).



**Figura 13.** Efectele administrării 6HNic asupra activității specifice a SOD (a), GPX (b), CAT (c) și a GSH redus (d) precum și asupra nivelurilor de MDA (e) în șobolanii tratați cu scopolamină (Hritcu și colab., 2015)

### II.3. Metode de obținere a 6-hidroxicotinei

#### Chemosinteza

O modalitate de a obține 6HNic o reprezintă sinteza chimică. Reacțiile chimice care introduc substituenți în nucleul piridinic al nicotinei și a alcaloizilor nicotiniici, poate menține integritatea configurației moleculei "parentale", și astfel, pot constitui mijloace utile și rapide de generare a unor derivați stereochemici cu importanță farmacologică și toxicologică. Una dintre primele reacții de substituție a nicotinei a fost descrisă de Tshitschibabin care a obținut analogii 2-amino și 6-amino ai nicotinei prin reacția cu sodamide în toluen la reflux. De asemenea, 6HNic se poate obține prin diazotizarea 6-aminonicotinei urmată de hidroliza cu apă (Crooks, 1999).

#### Biosinteza

Având în vedere potențialul menționat mai sus a 6HNic ca agent protector în tulburările neurodegenerative precum boala Alzheimer, este necesară o metodă simplă, adecvată și eficientă pentru a obține 6HNic.

*In vitro*, se poate obține 6HNic prin purificarea enzimei nicotin-dehidrogenazei (NDH) urmată de tehnici de cromatografie de înaltă performanță în mediu lichid (HPLC) și de electroforeză capilară (Igloi și Brandsch, 2003).

Un studiu recent (Andrei și Mihășan, 2013) s-a axat pe izolarea și clonarea moleculară a genelor NDH într-un vector adecvat (pART2 din *Escherichia coli*) care să permită simpla purificare a acestei enzime în formă activă.

Genele *ndhLSM* sunt responsabile de codificarea subunităților ce intră în componența enzimei NDH. Un fragment de ADN conținând aceste gene a fost izolat prin PCR (Polymerase Chain Reaction) de pe megaplasmidul pAO1 al speciei *Arthrobacter nicotinovorans* (Andrei și Mihășan, 2013).

După amplificarea cu succes a genelor *ndhLSM*, atât fragmentul de interes cât și vectorul pART2 izolat din *Escherichia coli* au fost supuși clivării cu enzime de restricție ceea ce a dus la obținerea de capete coezive. Ulterior, vectorul și fragmentul amplificat au fost supuși ligării rezultând astfel o moleculă de ADN recombinant. După ligare și transformare, au fost obținute un număr de 12 colonii. ADN-ul plasmidic din aceste colonii a fost izolat și

analizat prin electroforeză în gel de agaroză. Din cele 12 colonii, doar una a migrat la electroforeză diferit față de celelalte (Andrei și Mihășan, 2013).

Verificarea clonei pozitive a fost realizată printr-o digestie enzimatică controlată prin tăierea într-un situs existent numai în fragmentul clonat. ADN-ul izolat din colonia identificată a fost supus clivării cu enzime de restricție și s-a identificat prezența fragmentului introdus în vector. Acest lucru a demonstrat faptul că procesul de clonare a avut succes obținându-se astfel o moleculă hibridă (Andrei și Mihășan, 2013).

Vectorul recombinant poate fi utilizat în aplicații de purificare a enzimei NDH și de a obține 6HNic dar cantitatea de enzimă purificată este foarte scăzută, făcând ca această metodă să fie inutilizabilă în producerea de 6HNic. (Andrei și Mihășan, 2013).

Lucrarea aceasta face primele eforturi considerabile pentru elaborarea unei metode de producere a 6HNic prin utilizarea directă a unei tulpini de *Arthrobacter nicotinovorans* ce conține megaplasmidul pAO1. Această metodă presupune identificarea unor condiții optime de separare a 6HNic din mediul de cultură a microorganismului *Arthrobacter nicotinovorans* cu scopul de a obține 6HNic cu cel mai bun randament.

### III. MATERIALE ȘI METODE

#### III.1. Tulpini utilizate și condiții de creștere

##### III.1.1. Tulpinile folosite în acest studiu

Tulpinile de microorganisme, plasmidele și substanțele chimice folosite pentru elaborarea unei metode de obținere a 6HNic sunt:

1. *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+, pAO1-, sunt tulpini primite cadou din partea Prof. Dr. Roderich Brandsch (Institutul de Biochimie și Biologie Moleculară, Universitatea Albert-Ludwigs din Freiburg, Germania);
2. Kanamicină (Sigma-Aldrich, Germania);
3. Extract de drojdie (Merck, Germania);
4. Nicotină (Sigma-Aldrich, Germania);
5. 6-hidroxinicotină (a fost produs prin sinteză chimică și este un cadou generos din partea Prof. Dr. Roderich Brandsch);
6. Mediu citrat ce conține:
  - 2 g citrat de sodiu (Chemical Company, România);
  - 2 g sulfat de amoniu (Reactivul București, România);
  - 4.92 g fosfat disodic (Reactivul București, România);
  - 3.06 g fosfat monopotasnic (Reactivul București, România);
  - apă distilată 950 ml;
7. Soluție de minerale (Eberwein et al., 1961) ce conține:
  - 0.75 g clorură de calciu;
  - 4.58 g acid boric;
  - 3.5 g sulfat de zinc;
  - 0.22 g molibdat de sodiu;
  - 0.22 g sulfat de fier;
  - 0.24 g sulfat de mangan;
  - 0.1 g sulfat de cupru;
  - 0.1 g sulfat de cobalt;
  - 2 g fosfat monopotasnic;
  - 2 g sulfat de magneziu;

- 7.5 g acid etilendiaminotetraacetic (EDTA);
  - 1 L apă distilată;
8. Boxă cu flux de aer laminar, clasă biologică 2, EBSCO;
  9. Incubator cu agitare GFL 3031.

### III.1.2. Condiții de creștere

Tulpinile de *Arthrobacter nicotinovorans* cu plasmidul pAO1 (pAO1+) și fără (pAO1-) au fost cultivate pe mediu citrat solid. Acest mediu de cultură a fost suplimentat cu antibiotic (35 μg/ml kanamicină), nicotină (0.05%) și soluție de minerale (5%).

Plăcile cu mediu citrat solid pe care au fost însămânțate tulpinile de *A. nicotinovorans* au fost incubate la temperatura optimă de creștere de 28°C timp de 48 de ore.

Pentru cultivarea în mediu lichid (pre-cultură), s-au folosit câte o colonie de pe placa cu *A. nicotinovorans* pAO1+ respectiv pAO1-. Aceste colonii au fost inoculate în 10 ml mediu citrat lichid suplimentat cu extract de drojdie, soluție de minerale (5%), kanamicină (35 μg/ml) și nicotină (0.05%). Pre-culturile au fost incubate peste noapte într-un agitator termostatat la 190 rpm și la temperatura optimă de creștere de 28°C.

Volume mari de culturi de *A. nicotinovorans* s-au obținut folosind drept inocul pre-culturi cultivate peste noapte în volume mici (10 ml). Pentru inoculare, s-au diluat pre-culturile 1:100 și s-au introdus în flacoane Erlenmeyer cu un volum de cinci ori mai mare decât al culturii propriu-zise urmând apoi să monitorizăm din oră în oră creșterea celor două tulpini utilizând spectroscopia UV-VIS.

### III.2. Spectroscopia UV-VIS

Metodele spectrometriei de absorbție moleculară presupun trecerea unui fascicul de radiații prin proba de analizat, urmată de măsurarea intensității radiației transmise (Tofan et al., 2009)

O metodă simplă, rapidă și utilizată în mod obișnuit pentru a determina o creștere bacteriana, este de a măsura turbiditatea culturii utilizând un spectrofotometru. Pe măsură ce numărul de celule din soluție crește, soluția devine tot mai tulbure. Cu toate acestea, turbiditatea culturii este determinată atât de celulele vii cât și de cele moarte respectiv de alte particule prezente în mediul de cultură. De asemenea, forma, dimensiunea și compoziția celulelor pot influența turbiditatea. Toate aceste motive pot constitui surse de erori la

stabilirea numărului de celule dintr-o cultură bacteriană prin folosirea spectroscopiei UV-VIS (Mihășan et al., 2012).

### III.2.1. Materiale necesare

Materialele necesare pentru monitorizarea creșterii bacteriene sunt:

1. Mediu citrat lichid steril;
2. Culturi de *A. nicotinovorans* pAO1+ și pAO1-;
3. Spectrofotometrul Beckman Coulter DU 730 Life Science esențial pentru monitorizarea creșterii celor două culturi de *A. nicotinovorans*, cu o serie de parametri funcționali precum:
  - Diagnosticare de pornire și o serie de controale de sistem pentru a garanta că instrumentul efectuează conform specificațiilor zilnice;
  - Atât lampa UV cât și cea VIS pot fi oprite automat și independent pentru a proteja lămpile și de a economisi energie;
  - Lungime de undă fixă;
  - Se pot analiza proteine, acizi nucleici sau probe enzimatic;
  - Scanarea este posibilă într-un intervalul de lungimi de undă cuprins între 190-1100 nm;
  - Fascicul focalizat;
  - Interfață de tip touch-screen;
  - Stocarea automată sau manuală a datelor (Beckman Coulter®, 2005).
4. Două cuve de quartz.

### III.2.2. Mod de lucru

Creșterea numărului de celule din cele două flacoane Erlenmeyer determină o intensificare a turbidității culturii care poate fi înregistrată prin măsurarea cantității de lumină împrăștiată de cultură la o lungime de undă de 660 nm. Cu ajutorul spectrofotometrului, am măsurat densitatea optică (DO).

S-a adus spectrofotometrul la 0 folosind mediu citrat steril (blank). Din oră în oră (timp de 18 ore), s-au prelevat câte 2 ml din cele două culturi. Din cantitatea prelevată, 1 ml a fost centrifugat la 4000 rpm timp de 5 minute urmând apoi să fie stocat la -20°C pentru analiza HPLC și 1 ml a fost centrifugat în aceleași condiții, supernatantul fiind analizat la spectrofotometru la lungimea de undă de 585 nm pentru a monitoriza evoluția pigmentului

albastru. Depozitul celular a fost resuspendat într-un ml de mediu citrat lichid apoi s-a citit extincția la 660 nm pentru a monitoria creșterea bacteriană.

### **III.3. Cromatografia de înaltă performanță în mediu lichid (HPLC)**

Mikhail Tswett, un botanist rus, a inventat tehnica cromatografică în jurul anului 1900 prin separarea din frunzelor unor plante a pigmentilor fotosintetici folosind o coloană de carbonat de calciu ca fază staționară și a stabilit prezența mai multor compuși chimici. Tot el a inventat termenul "cromatografie" compus din cuvintele grecești "chroma" (culoare) și "graphein" (a scrie) deoarece a obținut benzi colorate în timp ce pigmentii strabăteau coloana (Mallik și Chakravarti, 2008).

Premiul Nobel din 1952 în domeniul chimiei a fost acordat lui Archer John Porter Martin și Richard Laurence Millington Synge pentru inventarea cromatografiei de partiție. La începutul acelei perioade, tehnicile cromatografice s-au dezvoltat rapid și au fost dezvoltate metode de specialitate pentru separarea moleculelor mult mai mari precum peptide și proteine. Este interesant de observat că într-o metodă mai recentă cum ar fi cromatografia de înaltă performanță în mediu lichid de fază inversă (RP-HPLC), moleculele mici pot fi reținute pe fază staționară prin partiționare, în timp ce polipeptidele sunt în general reținute prin absorbție (Mallik și Chakravarti, 2008).

La sfârșitul anilor 1970, au fost obținute progrese remarcabile în viteză, calitate și automatizare în domeniul purificării de proteine cu introducerea tehnicilor de HPLC (**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography) (Mallik și Chakravarti, 2008).

#### **III.3.1. Principiul general al cromatografiei**

Termenul de cromatografie cuprinde o serie de metode de analiză sau de separare preparativă de amestecuri de molecule chimice sau biologice bazate pe eluția lor diferențială la trecerea unei faze mobile (eluent) printr-o fază staționară (coloană). Într-o metodă tipică de cromatografie, amestecurile ce urmează a fi separate sunt transportate de faza mobilă, ce are o compoziție constantă sau variabilă, prin faza staționară unde are loc eluția. Ca parte a procesului, componentele separate sunt detectate, colectate și cuantificate în funcție de necesități. În funcție de starea de agregare a fazei mobile, se cunosc două metode cromatografice: cromatografia gazoasă (GC) și cromatografia lichidă (LC) (Mallik și Chakravarti, 2008).

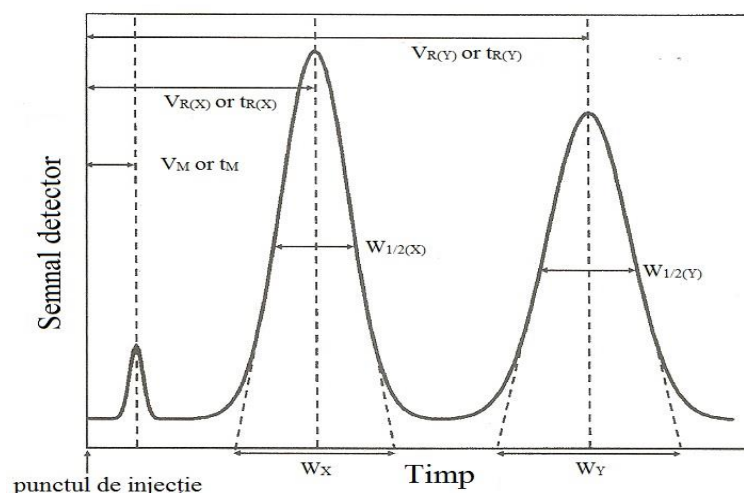


În tehnicile de LC și HPLC, în general, se folosesc coloane (tuburi în care se găsește împachetată faza staționară). Faza mobilă este apoi lasată să curgă (sau să străbată forțat ca în cazul HPLC) prin faza imobilă (staționară). În LC și în HPLC sunt folosite materiale speciale în alcătuirea fazei staționare ce permit o eluție a fazei mobile cu o presiune moderat-înaltă. Presiunea determină o eluție mai rapidă pe coloana cromatografică. Proba, care este un amestec din mai multe substanțe, este introdusă într-un capăt al coloanei urmată de eluția cu faza mobilă spre celălalt capăt (Mallik și Chakravarti, 2008).

În funcție de coeficienții de partiție și distribuție dintre faza mobilă și cea staționară, componentele din probă străbat coloana în diferite intervale de timp (timpuri de retenție). Componentele separate din probă sunt colectate la capătul terminal al coloanei, detectate precum și înregistrate sub formă de grafic. Aceste grafice poartă denumirea de cromatograme (Figura 1). Ideal, fiecare component este reprezentat în cromatogramă sub forma unei curbe de distribuție Gauss (vârf – *peak*) (Mallik și Chakravarti, 2008).

În figura 14, primul sau cea mai mică curbă denotă eluția unei soluții care nu este reținută în coloană și care trece prin faza staționară cu aceeași viteză pe care o are faza mobilă. Timpul de retenție corespunzător concentrației maxime (reprezentat de maximum *peak-ului*) a acestei soluții este  $t_M$ . Timpul de retenție depinde de lungimea coloanei, precum și de debitul eluției fazei mobile. Volumul corespunzător fazei mobile ( $V_M$ ) este cunoscut drept spațiul mort al coloanei și este egal cu volumul fazei mobile în jurul și în interiorul particulelor de fază staționară, în coloană (Mallik și Chakravarti, 2008).

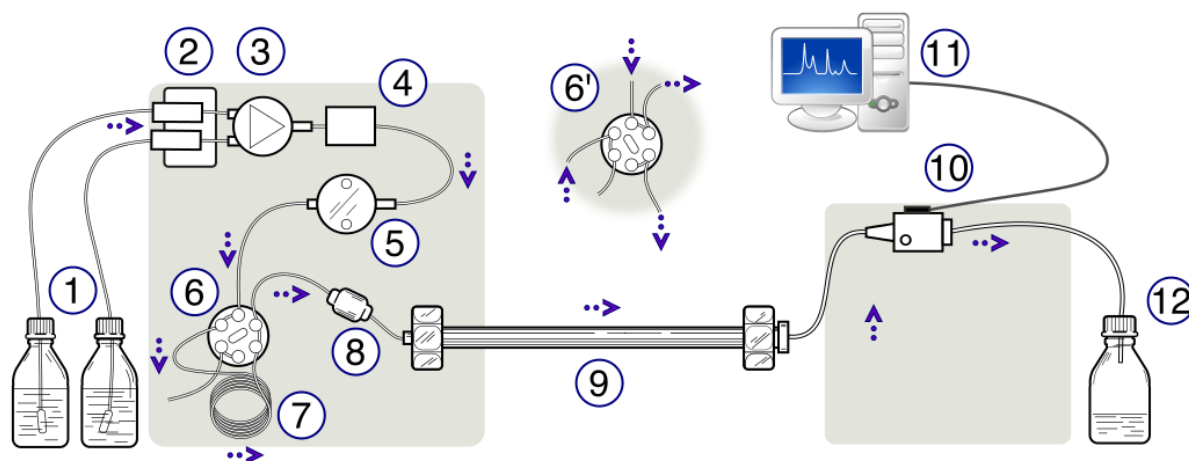
Volumul de fază mobilă necesar pentru eluția unei soluții, la concentrația ei maximă, se numește volum de retenție ( $V_R$ ) și timpul corespunzător este cunoscut drept timp de retenție ( $t_R$ ) (Mallik și Chakravarti, 2008).



**Figura 14.** Reprezentarea schematică a unei cromatograme împreună cu diverși parametri cromatografici ( $t_M$ ,  $V_M$  – timpul, respectiv volumul de retenție a fazei mobile;  $V_{R(X)}$ ,  $V_{R(Y)}$  – volumele de retenție a componentelor X și Y din amestec;  $t_{R(X)}$ ,  $t_{R(Y)}$  – timpii de retenție a componentelor X, respectiv Y din amestec;  $W_X$ ,  $W_Y$  – lățimea curbelor realizate de cele două componente) (Mallik și Chakravarti, 2008)

### III.3.2. Descrierea sistemului HPLC

Sistemul HPLC poate varia de la un sistem obișnuit, foarte simplu la un sistem extrem de sofisticat. Indiferent de gradul de sofisticare al aparatului, sistemul de bază necesar pentru a realiza o analiză HPLC este ilustrat în figura 15.



**Figura 15.** Reprezentarea schematică a unui sistem HPLC. Rezervoare cu fază mobilă (1), Degazare eluent (2), Valvă de gradient (3), Vas de amestecare a fazei mobile (4), Pompe de înaltă presiune (5), Valvă comutată în poziția de injecție (6), Valvă comutată în poziția de încărcare (6'), Bucla în care este injectată proba (7), Pre-coloană – coloană de siguranță (8), Coloana (9), Detectorul (10), Înregistrator de date – Sistem de date (11), Rezervor de deșeurii sau colector de fracții (12). (Imagine realizată cu Inkscape de Yassine Mrabet și legendă reproducă după Meyer, 2004)

### *Pompe*

Pompa poate fi considerată inima sistemului HPLC fiind instrumentul care pune în mișcare faza mobilă (Noctor, 1995). Pompele din sistemul HPLC trebuie să fie capabile să furnizeze un debit constant și reproductibil de fază mobilă spre coloană cu o presiune înaltă. O pompă eficientă trebuie să îndeplinească următoarele cerințe: flux stabil și fără pulsații, capacitatea de a oferi o serie de debite adecvate pentru diferite metode de HPLC, reproductibilitatea debitului (sau a presiunii) și capacitatea de a opera sub o presiune înaltă (Gilbert, 2013; Noctor, 1995)

### *Injector*

Pentru a obține o eficiență cromatografică maximă, proba de analizat trebuie introdusă în vârful coloanei ca o bandă extrem de îngustă. Presiunile înalte din HPLC necesită măsuri speciale pentru a introduce proba în cromatograf. Inițial, injecția în coloana HPLC a fost realizată printr-un sept, folosindu-se un ac subțire. Astăzi, marea majoritate a sistemelor HPLC folosesc injectoare de tip valvă. Injectoarele pentru HPLC trebuie să fie capabile să introducă proba în vârful coloanei, să funcționeze sub o presiune înaltă și să fie reproductibile. De asemenea, injectoarele trebuie să fie fabricate din materiale care sunt compatibile cu diferiți eluenți. Cel mai frecvent material utilizat este oțelul inoxidabil. În mod obișnuit, sunt utilizate două tipuri de injectoare: injector cu sept/seringă și injector de tip valvă. Există mai multe modele de injectoare de tip valvă dar toate au anumite caracteristici comune. De exemplu, toate folosesc o ”bucă” care poate fi internă sau externă pentru a controla volumul probei injectate (Gilbert, 2013; Noctor, 1995).

### *Coloana cromatografică*

Cea mai comună formă de cromatografie este aceea în care sunt folosite coloane tubulare în care faza staționară este împachetată (Mallik și Chakravarti, 2008).

Cea mai importantă caracteristică a oricărui cromatograf este coloana, fiind instrumentul în care are loc separarea cromatografică. Cu toate acestea, importanța sa este adesea trecută cu vederea. Cea mai importantă caracteristică a coloanei care influențează rezultatele o reprezintă dimensiunea acesteia. În general, coloanele (care sunt de obicei fabricate din oțel inoxidabil) sunt de aproximativ 2.5 – 25 cm în lungime și au un diametru interior de câțiva milimetri. Dacă coloana este prea scurtă, atunci în mod clar coloana nu va avea suficientă putere pentru a realiza separarea, iar dacă este prea lungă, timpul de analiză se va extinde inutil. Cele mai frecvente coloane folosite în HPLC au dimensiuni de 10, 12.5, 15

și 25 de cm. Cele mai multe coloane HPLC au diametrul interior de aproximativ 5 mm, majoritatea fiind de 4.6 mm (Noctor, 1995).

O rezoluție bună nu poate fi atinsă fără o coloană împachetată cu materiale de înaltă calitate. Totuși, trebuie subliniat faptul că rezoluția obținută de la o coloană bine împachetată poate fi pierdută ușor dacă nu se acordă atenție la următoarele: tubul de legătură dintre coloană și detector trebuie să fie de o lungime și un calibru minim și nu ar trebui să existe spații moarte neantrenate de faza mobilă în partea de sus sau de jos a coloanei (Gilbert, 2013).

#### *Detectoare și înregistratoare (sisteme de date)*

În general, eluentul curge continuu printr-o coloană cromatografică pentru a separa un amestec de substanțe. De obicei, un detector este conectat în portul de ieșire a coloanei pentru detectarea optică a fiecărui component separat și un înregistrator grafic este conectat la detector. Detectarea se bazează de obicei pe măsurarea absorbției în UV. De asemenea, un calculator poate fi folosit pentru a înregistra semnalul detectorului (Mallik și Chakravarti, 2008).

Detectoarele folosite în LC trebuie să funcționeze cu înaltă precizie, sensibilitate și stabilitate și nu trebuie să afecteze în mod semnificativ separarea realizată de către coloană. Sistemele de manipulare a datelor pot varia de la un simplu înregistrator grafic care produce o înregistrare cromatografică de profil a eluției până la sisteme computaționale sofisticate (Gilbert, 2013).

### **III.3.3. Materiale necesare**

Materialele necesare pentru stabilirea unor condiții optime de separare a nicotinei de 6HNic din mediul de cultură a microorganismului *A. nicotinovorans* sunt:

1. Faza mobilă compusă din două soluții:
  - Acid sulfuric 1 mM, 1000 ml (Reactivul București, România);
  - Metanol de puritate 99 %, 1000 ml (Sigma-Aldrich, Germania);
2. Faza staționară este împachetată într-o coloană Nucleodur<sup>®</sup> C18ec de fază inversă (RP) cu următoarele specificații:
  - Recomandată pentru separarea compușilor: medicamente bazice, neutre sau acide, pesticide, vitamine liposolubile, aldehide, cetone și compuși fenolici;
  - Calitate superioară de împachetare și o bună stabilitate la pH cuprins între 1-9;

- Separarea se bazează pe proprietatea de hidrofobicitate;
  - Dimensiunea porilor este de 110 Å cu particule de 3 μm, octadecil (C18), densitate medie și cu un atom de azot terminal;
  - Conținutul de carbon este de 17.5%;
  - Deoxidul de siliciu este principalul material din care este fabricată coloana (Macherey-Nagel, n.d.)
  - Dimensiunea coloanei este de 150 mm, iar diametrul este de 4.6 mm;
3. Sistem HPLC Bischoff (Figura 16) dotat cu:
- Două pompe HPLC – Pump 2250 cu un debit cuprins între 0.1 - 4.99 ml/min;
  - Injector cu sept/seringă și cu o buclă pentru probă de 20 μl;
  - Detector DAD 100 – EU, 100 – OU cu un interval de lungimi de undă cuprins între 190 – 390 nm;
  - Sistem de control LC–CaDI 22-14;
  - Program de înregistrare a cromatogramelor McDAD100 Control Center;
4. Nicotină (Sigma-Aldrich, Germania);
5. 6-hidroxinicotină (a fost produs prin sinteză chimică și este un cadou generos din partea Prof. Dr. Roderich Brandsch).



**Figura 16.** Sistemul Bischoff utilizat în acest studiu

### III.3.4. Mod de lucru

Etapele parcurse în stabilirea unor condiții optime de separare cromatografică a nicotinei de 6HNic sunt următoarele:

1. Pompele au fost amorsate utilizând ca fază mobilă acid sulfuric și metanol pentru a elimina aerul din instalația cromatografică. Debitul utilizat a fost de 1 ml/min. Faza mobilă a fost degazată în prealabil;
2. S-a echilibrat coloana utilizând aceeași fază mobilă până când citirea detectorului a devenit constantă;
3. Sistemul HPLC a fost etalonat folosindu-se 20  $\mu$ l din următoarele soluții: soluție de nicotină (0.05%), soluție de 6HNic (0.05%) și un amestec de nicotină și 6HNic (fiecare având concentrația de 0.05%). De asemenea, probele au fost scoase de la  $-20^{\circ}\text{C}$  dezghețate și centrifugate la 4000 rpm timp de 5 minute. După centrifugare, 20  $\mu$ l de supernatant (din fiecare probă) au fost injectați prin intermediul unei seringi în septumul injectorului. Injectorul a fost apoi trecut din poziția de injectare în cea de încărcare introducându-se astfel proba în sistemul HPLC.
4. După injectare, probele au fost supuse analizei cromatografice timp de 15 minute. Pentru separare, s-a folosit ca fază mobilă acid sulfuric și metanol. În urma consultării literaturii de specialitate, au fost selectate anumite condiții de separare a nicotinei de 6HNic. Aceste condiții presupun modificări la nivelul fazei mobile, mai precis, a raportului dintre acidul sulfuric și metanol.
5. La sfârșitul analizei cromatografice, datele au fost înregistrate sub forma unor cromatograme. În cromatograme, *peak-urile* au fost identificate automat, însă s-a preferat identificarea manuală a peak-urilor pe baza timpilor de retenție ( $t_R$ ). Cromatogramele au fost salvate ulterior sub forma unor rapoarte.

## VI. REZULTATE ȘI DISCUȚII

### IV.1. Stabilirea condițiilor optime de separare a 6HNic de nicotină utilizând HPLC

În ciuda faptului că același principiu de cromatografie de înaltă performanță în mediu lichid de fază inversă (HPLC-RP) se aplică în toate metodele descrise pentru separarea intermediarilor nicotinicici din amestecuri complexe, diferiți autori folosesc faze mobile care variază în funcție de concentrația acestora (Tabel 5).

**Tabel 5.** Condiții de separare folosite de diferiți autori pentru a separa sau identifica diferiți derivați nicotinicici

Coloană cromatografică	Fază mobilă	Raport	Debit/ Temperatură	Detectare UV-VIS	Referință
Kromasil KR100-5C18, 150mm×4.6mm; dimensiunea particulei este de 5μm	Metanol:1 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15:85	0,5 ml/ min / 30°C	210 nm	(Wang et al., 2005)
Kromasil KR100-5C18, 150mm×4.6mm; dimensiunea particulei este de 5μm	Metanol:1 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	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, 250 mm×4.6mm; 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, 250mm×64.6mm; dimensiunea particulei este de 5μm	Metanol:1 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5:95	0,5 ml/ min / 30°C	-	(Liu et al., 2014)

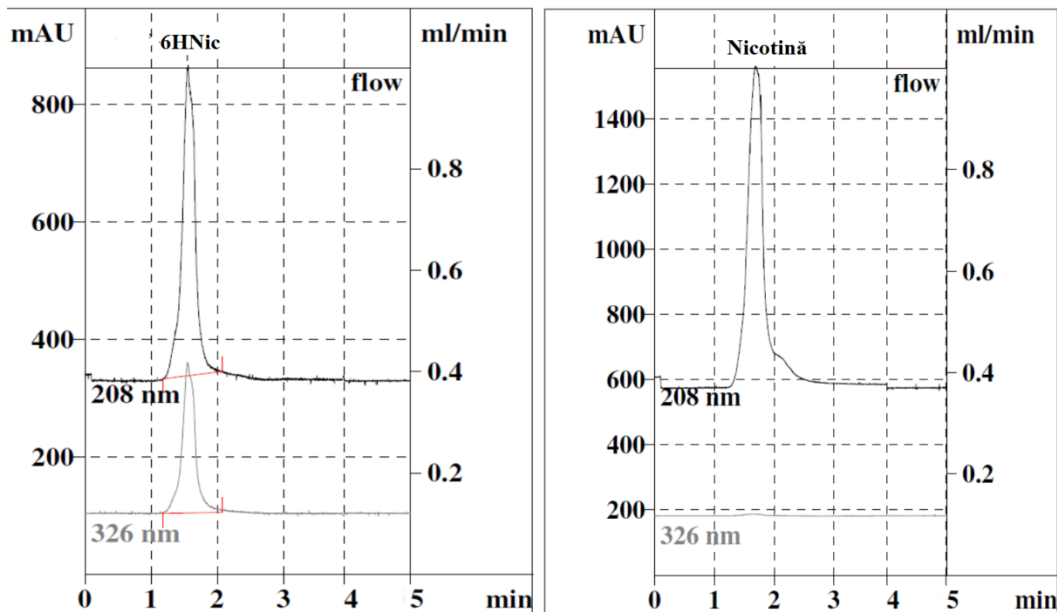
Consultând literatura de specialitate, diferiți autori au folosit o coloană cromatografică de fază inversă, octadecil (C18) cu dimensiunea particulelor de 5 μm, un debit de 0.5 ml/min și separarea a fost realizată la o temperatură de 30°C. Dimensiunile coloanelor cromatografice au variat de la 15 cm la 25 cm, iar diametrul de la 4.6 mm la 64.6 mm. În funcție de compușii analizați, s-au folosit ca fază mobilă amestecuri între diferiți solvenți (apă

distilată, metanol sau acid sulfuric), iar detectarea UV-VIS s-a realizat la diferite lungimi de undă.

În acest studiu, pentru separarea nicotinei de 6HNic s-a folosit o coloană Nucleodur C18ec de fază inversă asemănătoare cu cele întâlnite în literatură, însă există câteva diferențe semnificative. Această coloană are dimensiunea de 15 cm și un diametru de 4.6 mm. Dimensiunea particulelor este de 3 μm, iar separarea a fost efectuată la o temperatură de 22°C și debitul folosit a fost de 1 ml/min. Cei doi compuși au fost analizați la 208 nm respectiv 326 nm.

Analizând compoziția fazelor mobile listate în literatură, trebuie să stabilim un eluent și un raport optim al componentelor sale pentru a separa nicotina de 6HNic, doi compuși care diferă unul de celălalt printr-o grupare hidroxil.

În sistemul HPLC au fost injectate soluții pure de 6HNic, nicotină și un amestec din cele două substanțe. Aceste soluții au fost eluate folosind o fază mobilă compusă din acid sulfuric 1mM și metanol în diferite concentrații. Separarea nicotinei de 6HNic a fost evaluată pe baza timpilor de retenție a celor doi compuși (Figura 17).

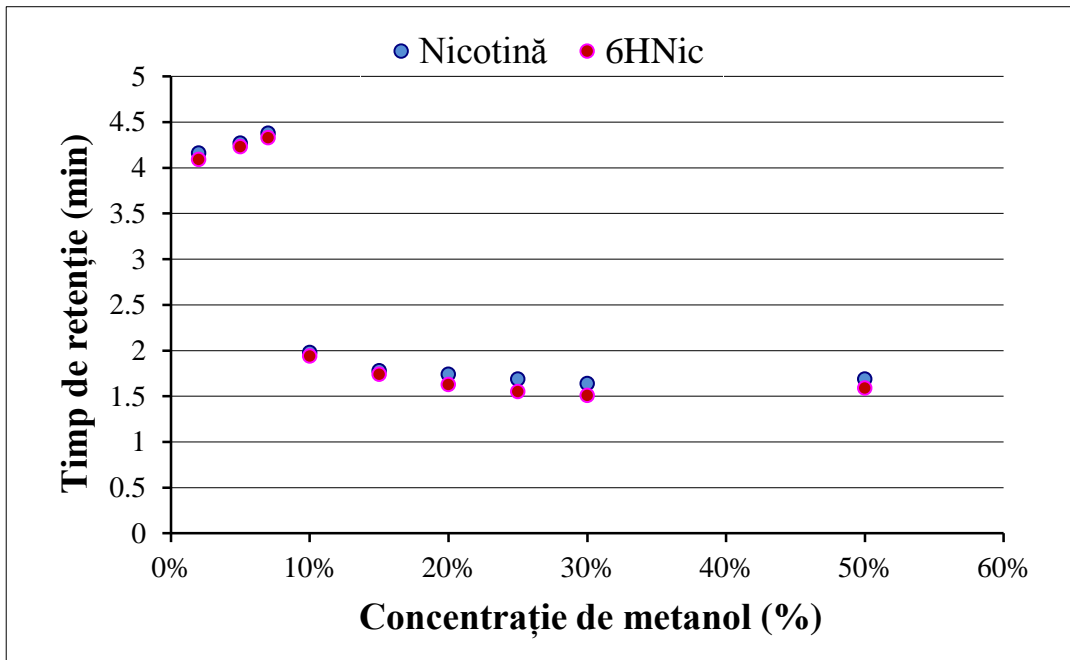


**Figura 17.** Cromatograme tipice pentru separarea nicotinei și a 6HNic folosind ca fază mobilă un amestec de metanol și acid sulfuric 1mM în raport de 25:75

Inițial, s-a observat că odată cu creșterea concentrației de metanol din faza mobilă crește și diferența dintre timpii de retenție a nicotinei respectiv a 6HNic ducând astfel la o separare eficientă, însă s-a constatat că diferența timpilor de retenție scade atunci când concentrația de metanol depășește 25%.



Astfel, amestecul de fază mobilă care a dat cele mai bune rezultate în ceea ce privește diferența dintre timpurile de retenție a nicotinei și a 6HNic s-a dovedit a fi: acid sulfuric 1mM și metanol în raport de 75:25 (Figura 18).



**Figura 18.** Dependența timpurilor de retenție față de concentrația de metanol

În urma injectării în sistemul HPLC a soluțiilor de nicotină, 6HNic și a amestecului dintre cei doi compuși s-au obținut o serie de cromatograme (subcapitolul VI.1), însă cea mai eficientă separare a nicotinei de 6HNic a putut fi observată în cele în care s-a folosit ca fază mobilă acid sulfuric și metanol în raport de 75:25.

#### **IV.2. Separarea cromatografică a mediului de cultură din *Arthrobacter nicotinovorans***

Studiile anterioare (Hrițcu et al., 2015; Mihășan et al., 2013) au demonstrat că 6HNic are efectele benefice asupra progresiei patologiei asemănătoare bolii Alzheimer, ameliorând tulburările de memorie prin atenuarea stresului oxidativ.

Prin utilizarea standardelor pure de 6HNic și nicotină, a fost posibilă stabilirea unei faze mobile ce poate fi utilizată pentru a separa eficient acești compuși foarte asemănători din punct de vedere structural. Faza mobilă optimă identificată în subcapitolul IV.1. a fost aplicată asupra mediului de cultură a microorganismului *A. nicotinovorans* pAO1+ cu scopul de a separa și izola 6HNic.

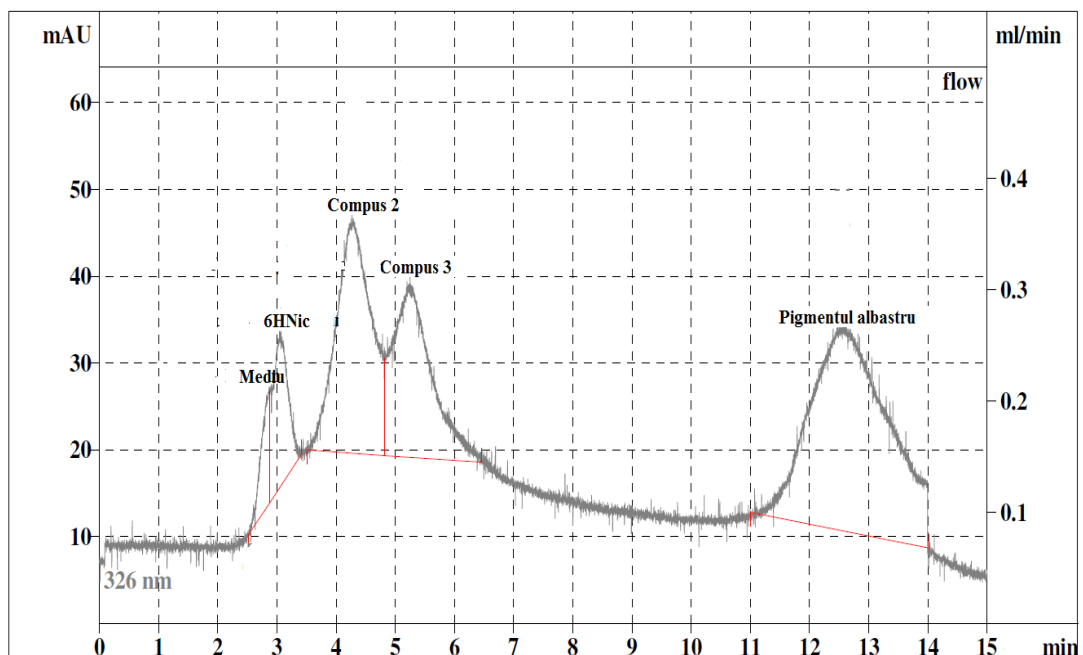
Atunci când microorganismul *A. nicotinovorans* pAO1+ este cultivat într-un mediu citrat suplimentat cu nicotină, această bacterie utilizează nicotina ca sursă de carbon și azot (Igloi și Brandsch, 2003).

În decursul a 18 ore de creștere, nicotina este degradată și în mediul de cultură se acumulează diverși produși de metabolism precum și 6HNic, un compus cu potențial biotehnologic. Analiza HPLC a mediului de cultură a acestui microorganism ne-a permis corelarea cu strictețe a principalelor faze de creștere bacteriană cu primii pași ai căii de degradare a nicotinei.

După stabilirea fazei mobile optime (acid sulfuric 1mM și metanol în raport de 75:25) pentru separarea nicotinei de 6HNic, aceasta a fost folosită pentru a separa probele recoltate din mediul de cultură a microorganismului *A. nicotinovorans* pAO1+.

Probele au fost injectate în sistemul HPLC și au fost transportate de faza mobilă optimă prin intermediul coloanei obținându-se astfel o serie de cromatograme în care au fost identificați pe baza timpilor de retenție, diverși produși de metabolism, nicotina și mediul citrat. Intermediarii metabolici identificați în mediul de cultură a speciei *A. nicotinovorans* pAO1+ sunt 6HNic, pigmentul albastru și un compus necunoscut (Figura 19).

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.



**Figura 19.** Cromatogramă tipică în care sunt prezentați compușii separați din mediul de cultură a microorganismului *A. nicotinovorans* pAO1+

### **IV.3. Dezvoltarea microorganismului *Arthrobacter nicotinovorans* pe medii cu nicotină**

Tulpinile de *Arthrobacter nicotinovorans* (cu plasmid – pAO1+ și fără plasmid – pAO1-) au fost crescute în mediu citrat lichid suplimentat cu nicotină, kanamicină și soluție de minerale.

Capacitatea bacteriei de a degrada nicotina din mediu se datorează prezenței în celulă a plasmidului pAO1 pe care se găsesc gene ce codifică enzimele implicate în această cale metabolică (Mihășan, 2011).

În natură, specia *A. nicotinovorans* conține megaplasmidul pAO1, însă tulpina care nu prezintă acest plasmid (pAO1-) a fost obținută în laborator prin creșteri succesive pe medii lipsite de nicotină dar bogate în glucoză. Prin cultivări succesive pe medii bogate în nutrienți, plasmidul pAO1 nu mai oferă un avantaj evolutiv bacteriei, atfel încât el poate dispărea. În cazul tulpinii pAO1- utilizate, plasmidul nu a fost complet pierdut ci integrat în cromozomul bacterian. Astfel, genele pentru metabolizarea nicotinei sunt inactivate și această tulpină poate fi folosită în acest studiu ca un control al dezvoltării bacteriene în prezența nicotinei dar fără a o putea metaboliza.

Primul intermediar metabolic care se formează în urma hidroxilării nucleului piridinic al nicotinei este 6-hidroxinicotina (6HNic), reacția fiind catalizată de enzima nicotin-dehidrogenaza (NDH) (Mihășan, 2011).

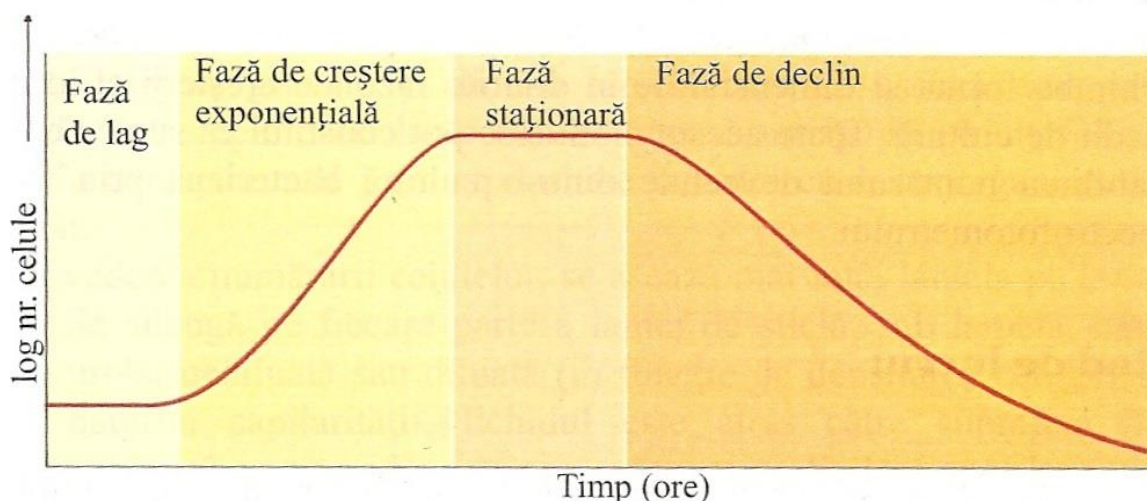
Primele cercetări asupra metabolismului nicotinei a microorganismului *Arthrobacter nicotinovorans* indică faptul că 6HNic este prezent în mediul de creștere, însă în cantități mici (Hochstein, L. și Rittenberg, 1958).

Pentru a identifica cel mai bun moment de recoltare a celulelor de *A. nicotinovorans* pAO1+ și de a obține cantități mai mari de 6HNic este necesară o corelație strictă între vârsta culturii microbiene și nivelul consumului de nicotină. De aceea, prima etapă a acestui studiu a constat în stabilirea clară a duratei specifice a fazelor de creștere în cazul bacteriei *Arthrobacter nicotinovorans*.

Atunci când o populație bacteriană se dezvoltă într-un mediu de cultură lichid, sunt parcurse patru faze: lag (de întârziere), exponențială (logaritmică), staționară și de declin (Figura 20) (Mihășan et al., 2012)

Faza de lag presupune o adaptare a celulelor bacteriene la noul mediu de viață. Această fază este caracterizată prin absența creșterii bacteriene. Durata fazei de lag poate fi scurtată dacă bacteriile dintr-o cultură aflată în faza exponențială sunt transferate într-un mediu

identic. Consecutiv fazei de lag este faza exponențială în care celulele bacteriene se divid, iar numărul lor crește logaritmice. În urma creșterii bacteriene, nutrienții disponibili în mediul de cultură sunt consumați, scade concentrația de oxigen dizolvat și se acumulează produși de metabolism. Faza staționară este caracterizată prin menținerea unui număr relativ constant de celule bacteriene, iar la final apare moartea celulară unde numărul de celule scade pe parcursul fazei de declin (Mihășan et al., 2012).



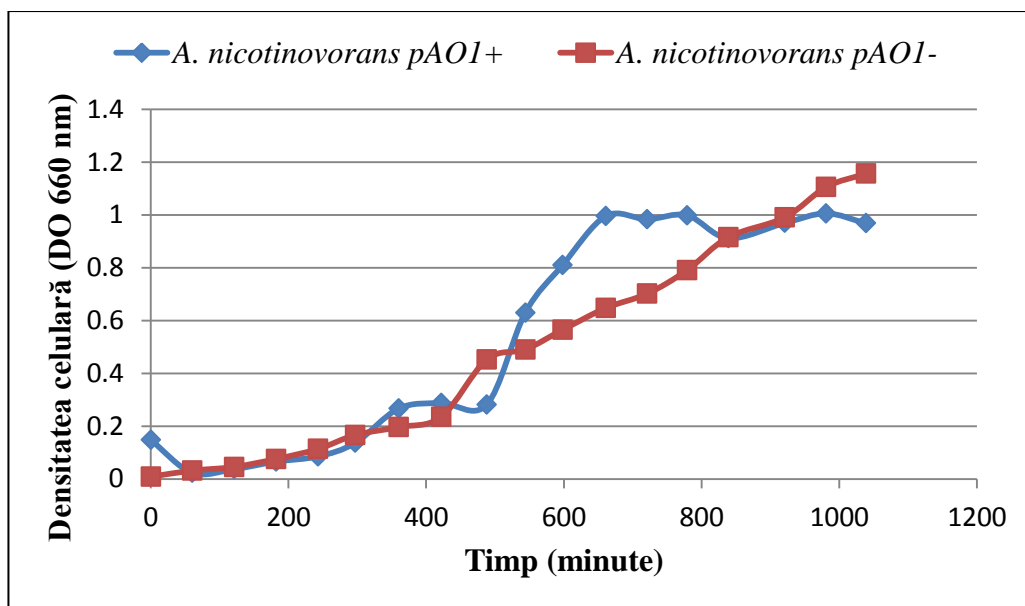
**Figura 20.** Curba de creștere a unei populații bacteriene în medii de cultură lichide (Mihășan et al., 2012)

Evoluția culturilor de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+ și pAO1- și fazele creșterii au fost urmărite prin determinarea numărului de celule (măsurarea turbidității) folosind spectroscopia UV-VIS.

Astfel, creșterea celor două tulpini de *A. nicotinovorans* pAO1+ și pAO1- în mediu citrat lichid au fost măsurate la 660 nm. Extincțiile au fost folosite pentru elaborarea unei curbe de creștere (Figura 21). Creșterea a fost la început corelată cu un indicator primar de epuizare a nicotinei din mediu și anume acumularea produsului final (pigmentul albastru) care poate fi urmărită la 585 nm (Figura 22).

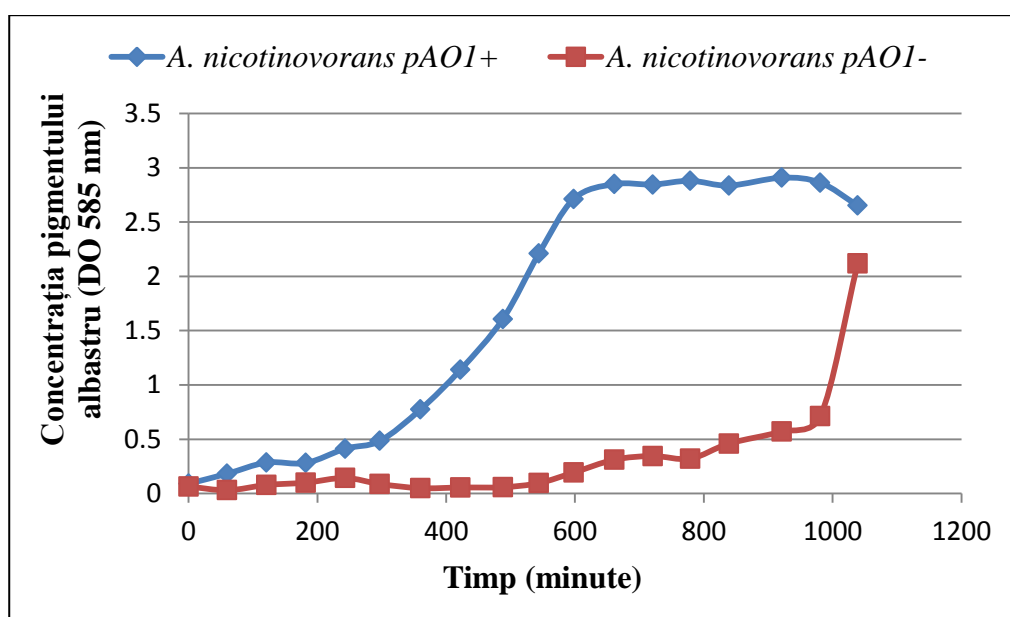
Fazele parcurse de o populație bacteriană care se dezvoltă într-un mediu lichid au fost identificate și în cazul celor două tulpini de *A. nicotinovorans*, însă monitorizarea acestora a luat sfârșit odată cu apariția fazei staționare.

După 5 ore de lag, cele două tulpini de *A. nicotinovorans* (pAO1+ și pAO1-) au intrat în faza de lag, iar după 10 ore au fost pe deplin dezvoltate. Odată cu încheierea fazei de lag, pigmentul albastru caracteristic a început să se acumuleze în mediul de cultură a tulpinii ce prezintă plasmidul pAO1.



**Figura 21.** Curba de creștere a tulpinilor de *A. nicotinevorans pAOI+* și *pAOI-* pe mediu cu nicotină

Pe durata fazei exponențiale, în mediul de cultură se acumulează intermediari metabolici, precum 6HNic deoarece metabolismul bacteriilor este unul intens. În faza staționară celulele de *A. nicotinevorans* sunt crescute și numărul de celule este relativ constant. Analiza curbei de creștere indică faptul că cel mai bun moment de recoltare a celulelor de *A. nicotinevorans pAOI+* pentru a obține o cantitate maximă de 6HNic este cuprins între faza de log și cea staționară adică între 5 și 18 ore. Pentru a afla cu precizie momentul optim sunt însă necesare studii suplimentare de dinamică a producerii de 6HNic.



**Figura 22.** Acumularea în timp a pigmentului albastru



## CONCLUZII

În urma experimentelor realizate, 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.

S-a stabilit de asemenea că utilizarea directă a celulelor de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+ cu scopul de a transforma nicotina într-un compus cu potențial biotehnologic precum 6HNic este realizabilă.

Lucrarea de față s-a constituit ca un punct de plecare pentru realizarea unor studii de dinamică a producerii de 6HNic de către microorganismul *Arthrobacter nicotinovorans*. În urma acestor studii s-a stabilit că momentul optim de recoltare a celulelor de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+ este după 11 ore de creștere pe mediu citrat suplimentat cu soluție de nicotină (0.05%).

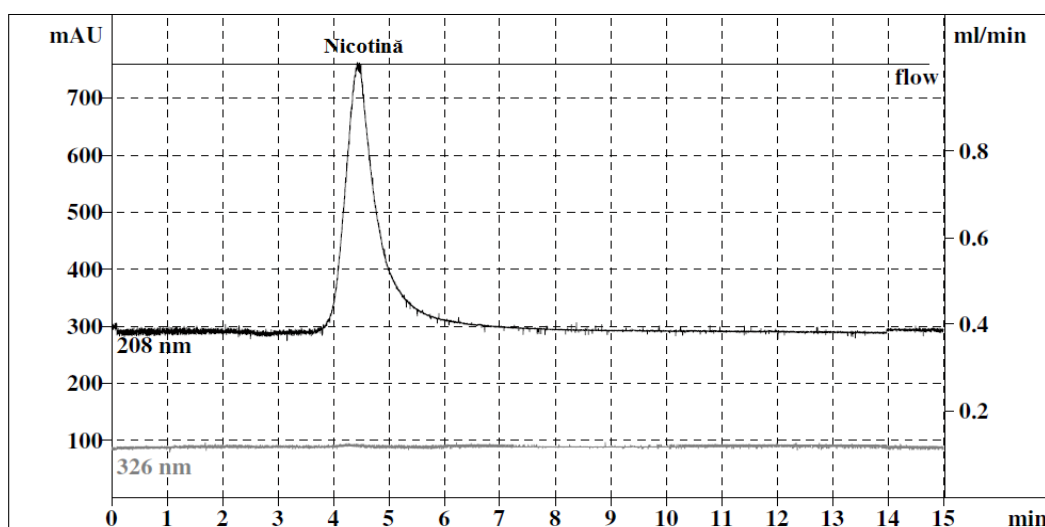




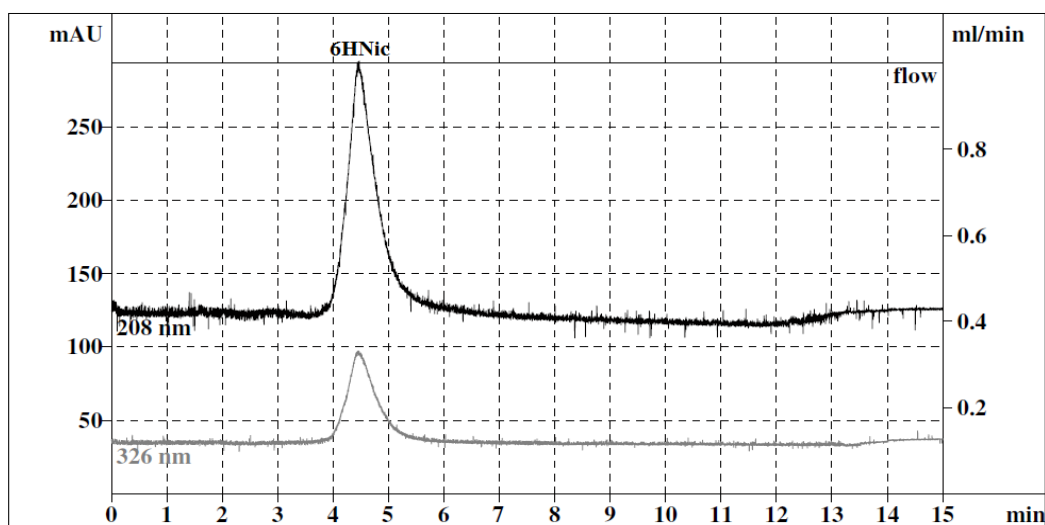
## ANEXE – Cromatograme generate în cadrul acestui studiu

### Cromatograme generate pentru stabilirea condițiilor de separare

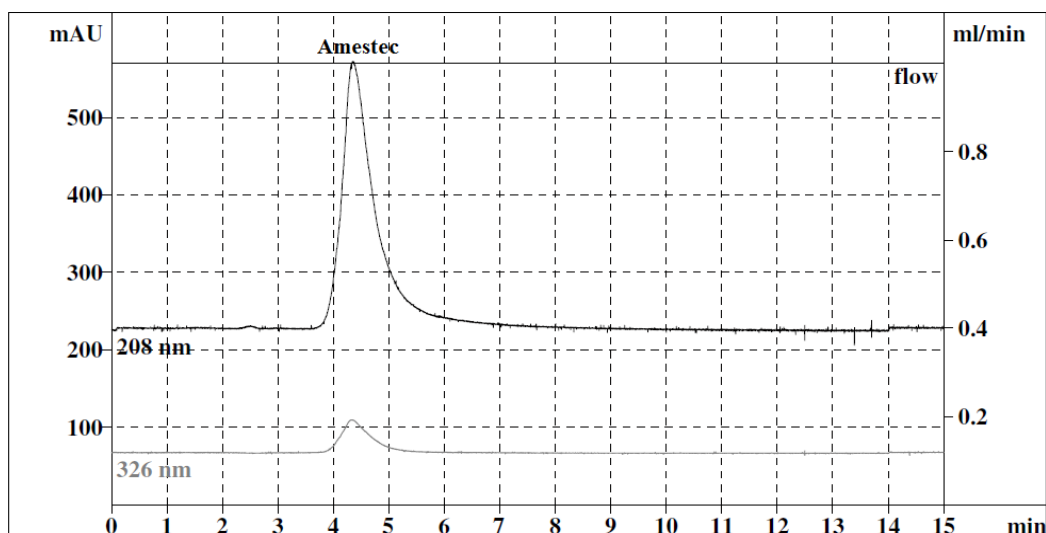
Faza mobilă: acid sulfuric 1mM și metanol în raport de 98:2



**Figura 23.** Cromatogramă obținută după injectarea nicotinei utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 98:2

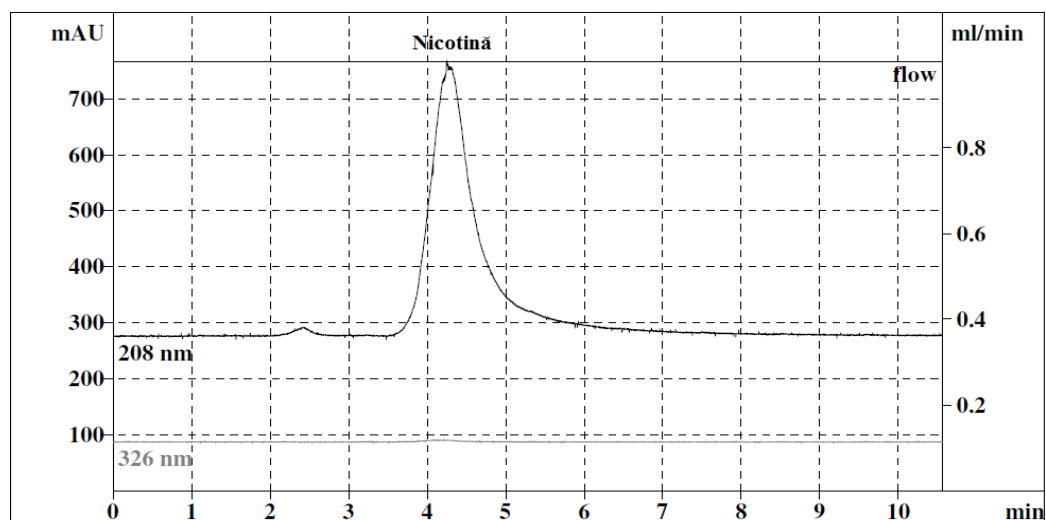


**Figura 24.** Cromatogramă obținută după injectarea de 6HNic utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 98:2

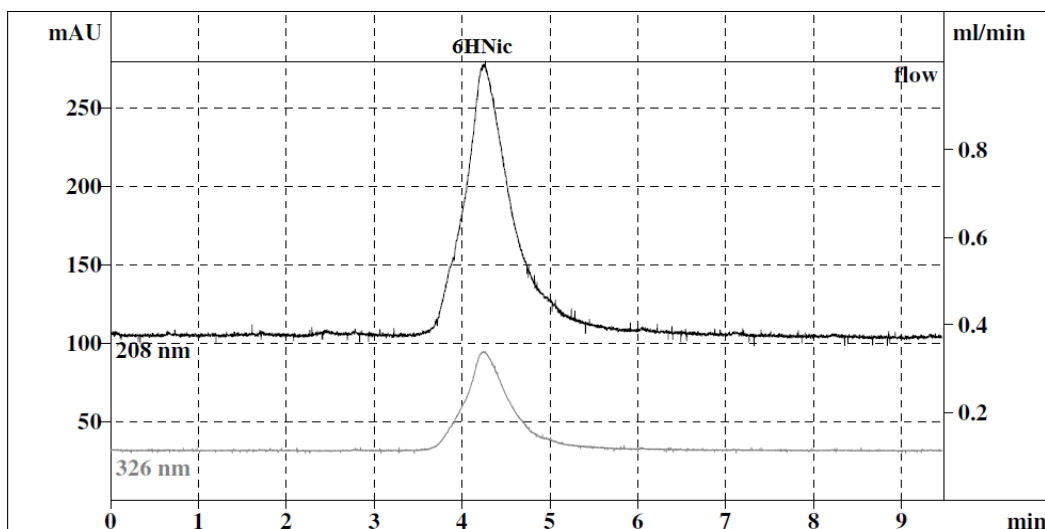


**Figura 25.** Cromatogramă obținută după injectarea amestecului utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 98:2

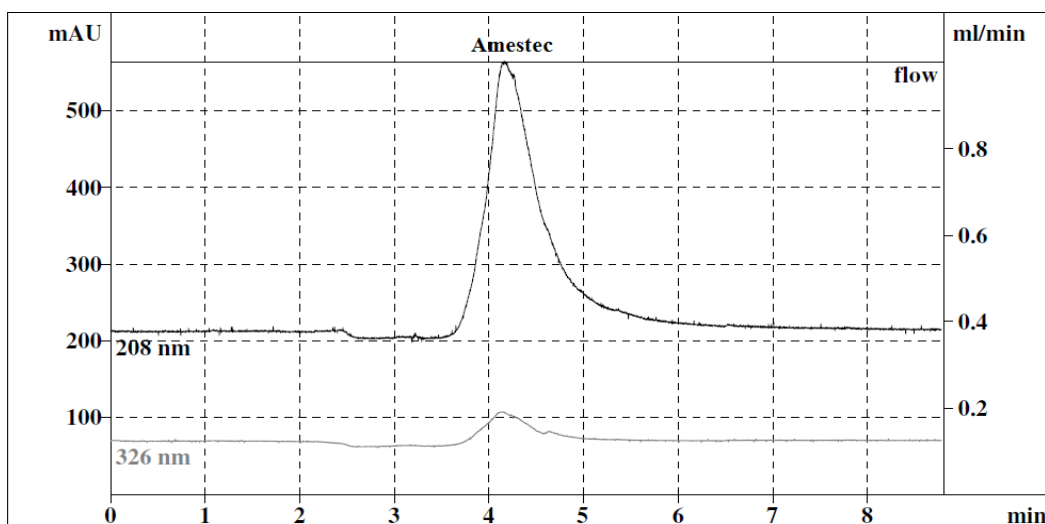
**Faza mobilă: acid sulfuric 1mM și metanol în raport de 95:5**



**Figura 26.** Cromatogramă obținută după injectarea nicotinei utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 95:5



**Figura 27.** Cromatogramă obținută după injectarea de 6HNic utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 95:5



**Figura 28.** Cromatogramă obținută după injectarea amestecului utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 95:5

Faza mobilă: acid sulfuric 1mM și metanol în raport de 93:7

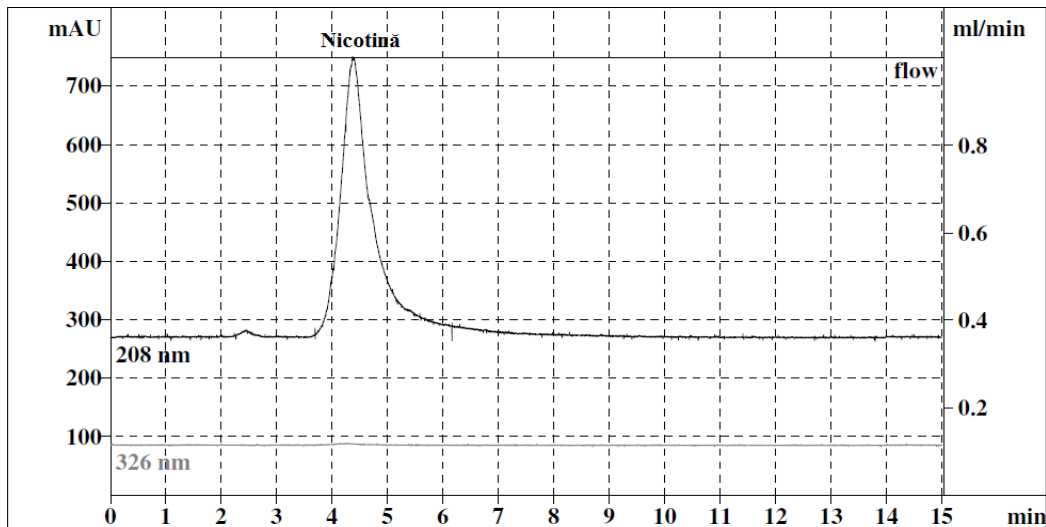


Figura 29. Cromatogramă obținută după injectarea nicotinei utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 93:7

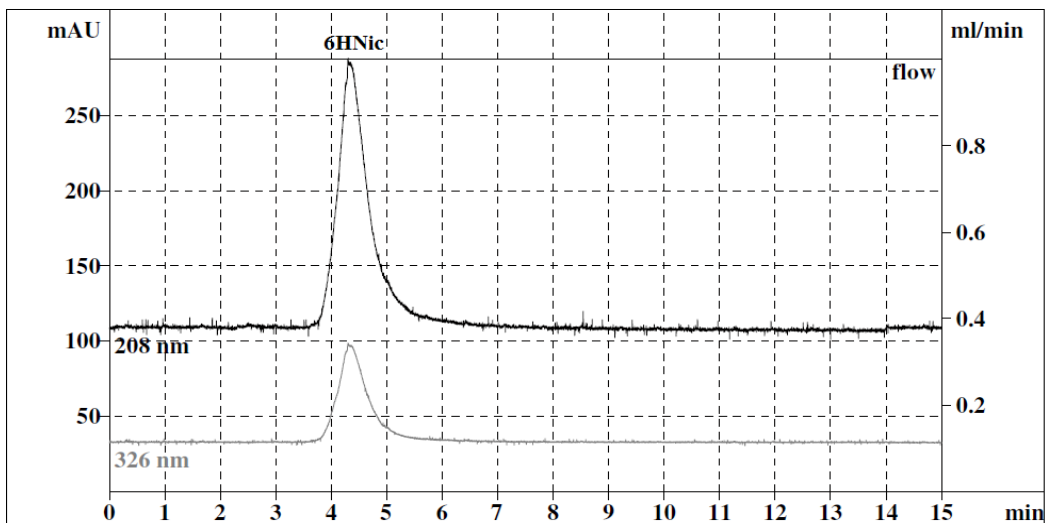
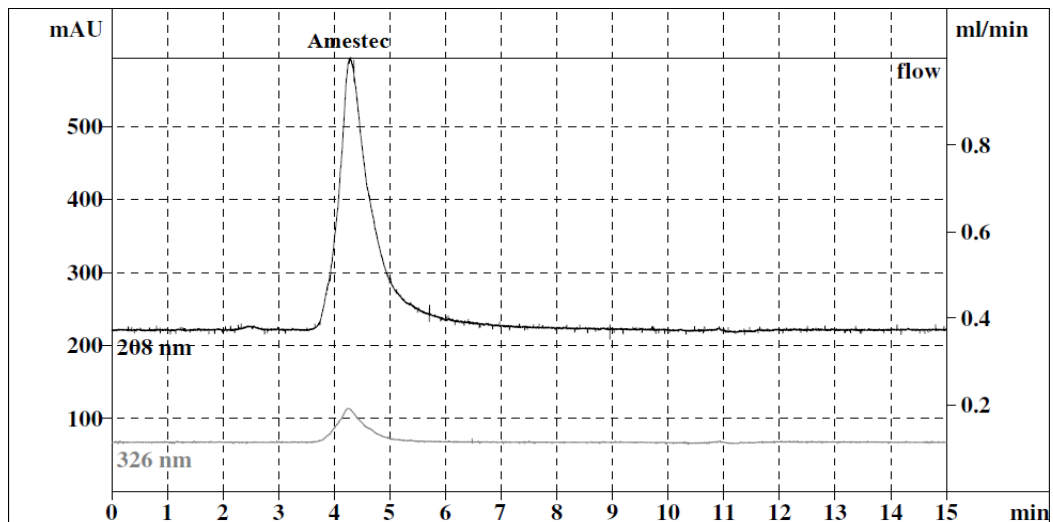
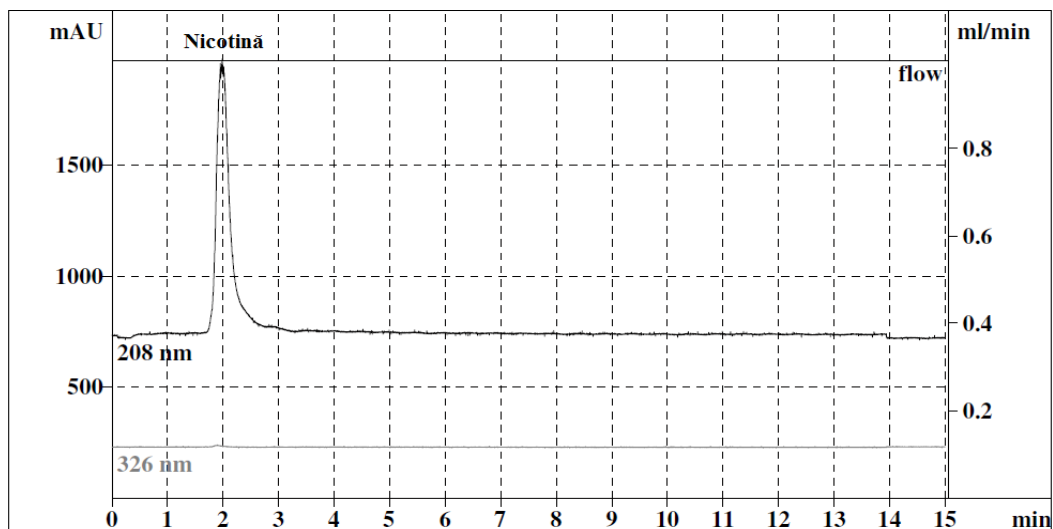


Figura 30. Cromatogramă obținută după injectarea de 6HNic utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 93:7

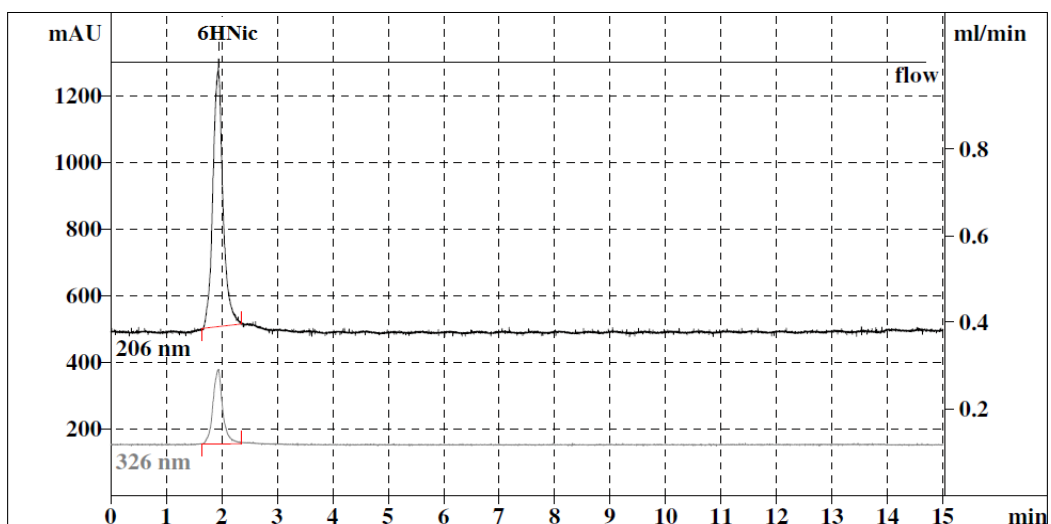


**Figura 31.** Cromatogramă obținută după injectarea amestecului utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 93:7

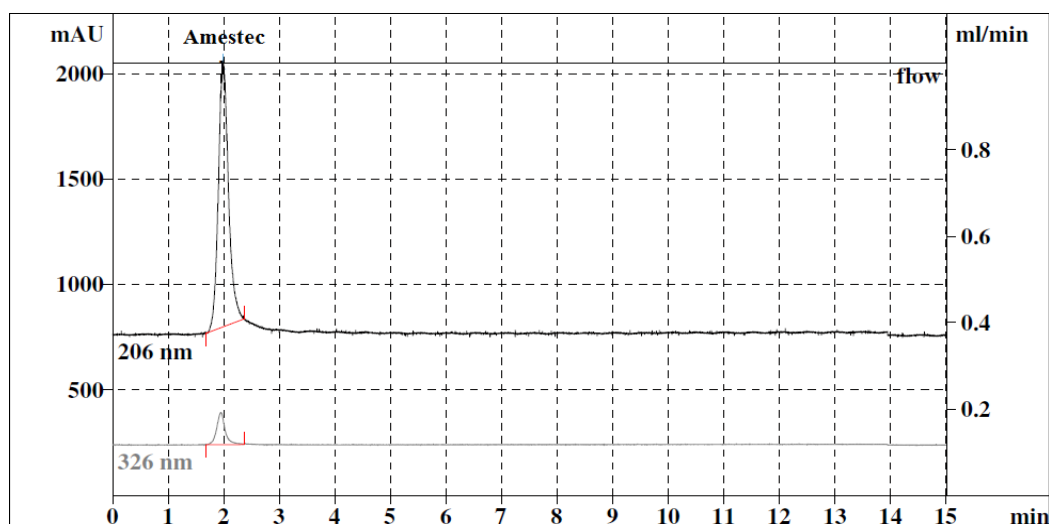
**Faza mobilă: acid sulfuric 1mM și metanol în raport de 90:10**



**Figura 32.** Cromatogramă obținută după injectarea nicotinei utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 90:10

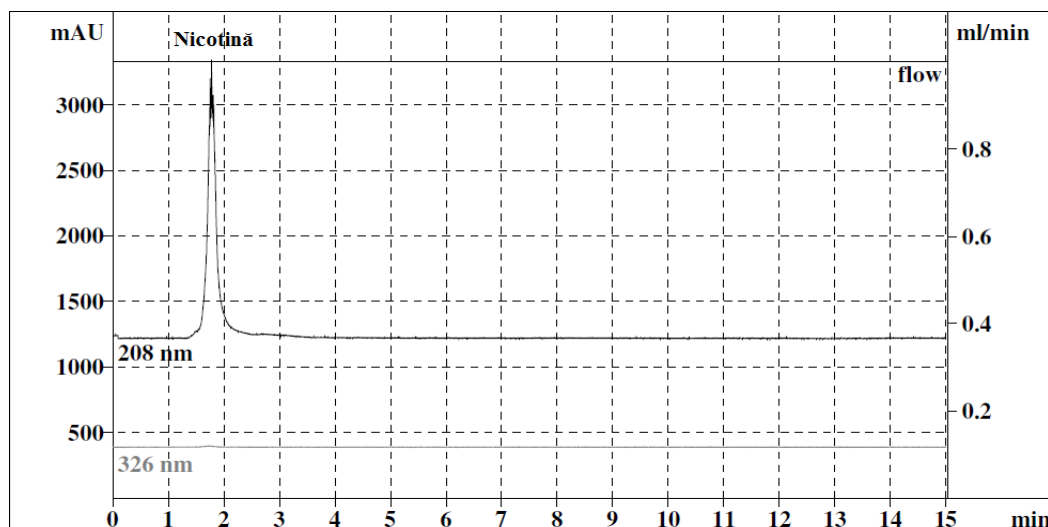


**Figura 33.** Cromatogramă obținută după injectarea de 6HNic utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 90:10

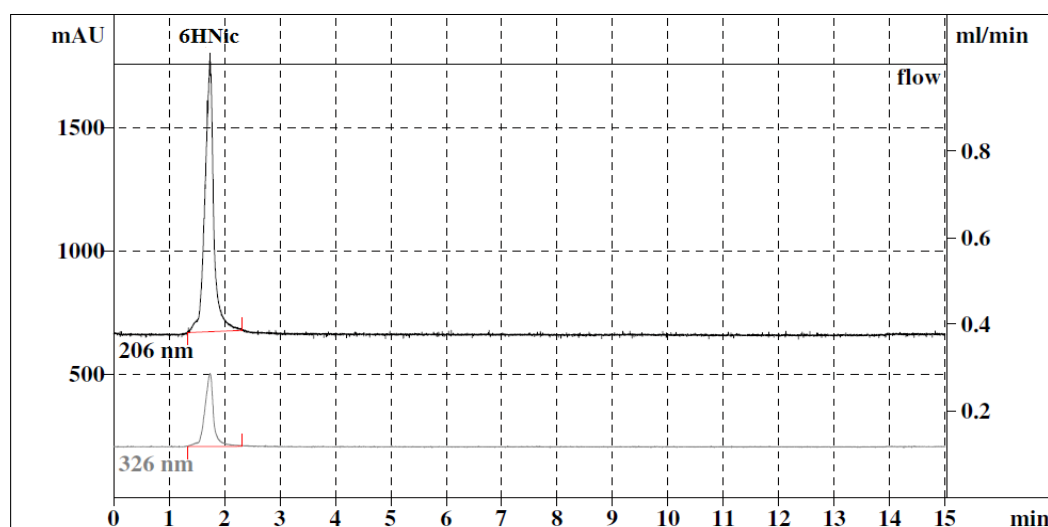


**Figura 34.** Cromatogramă obținută după injectarea amestecului utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 90:10

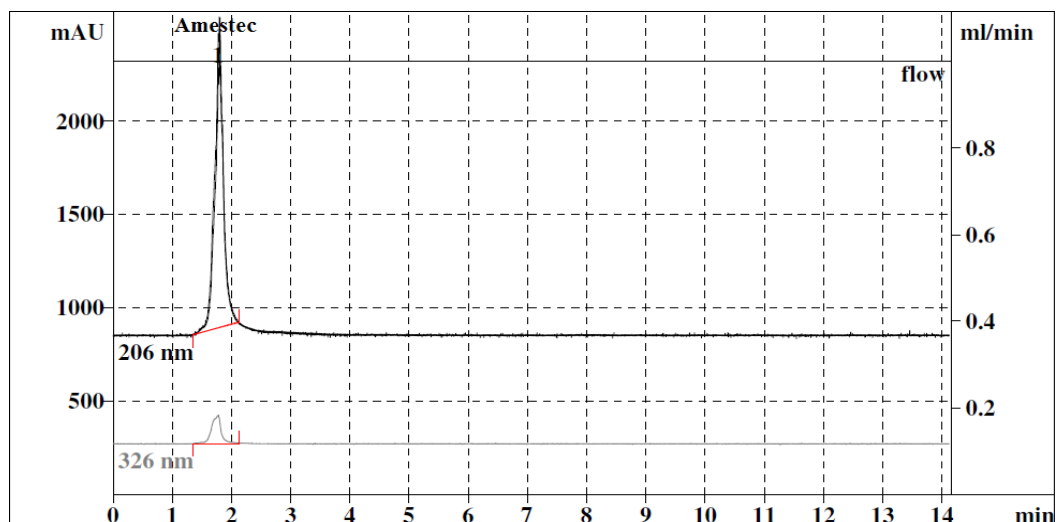
Faza mobilă: acid sulfuric 1mM și metanol în raport de 95:15



**Figura 35.** Cromatogramă obținută după injectarea nicotinei utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 85:15

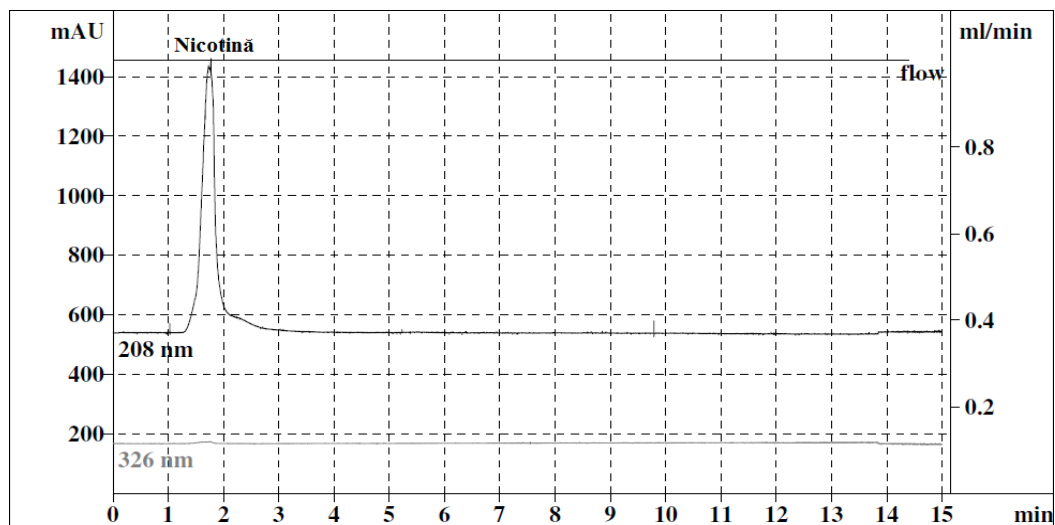


**Figura 36.** Cromatogramă obținută după injectarea de 6HNic utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 85:15



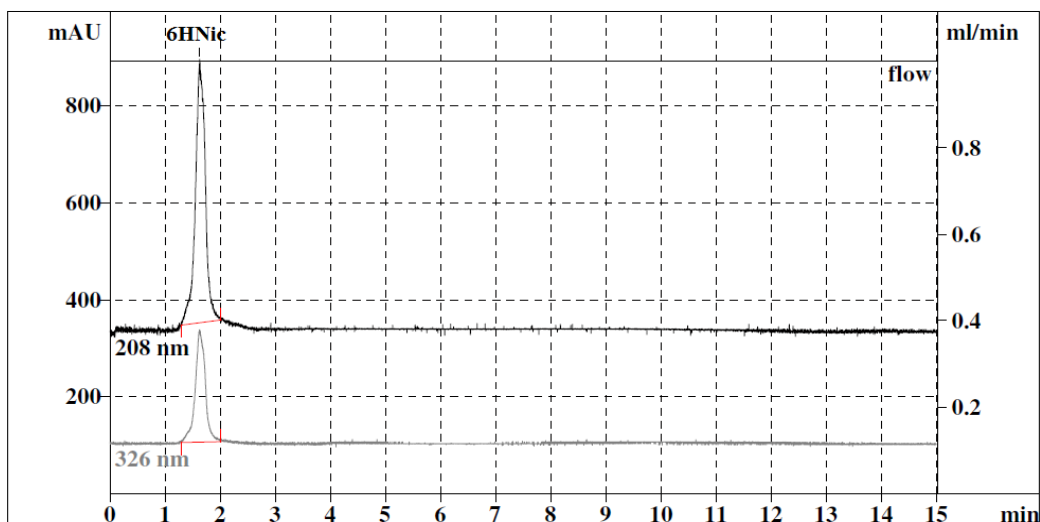
**Figura 37.** Cromatogramă obținută după injectarea amestecului utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 85:15

**Faza mobilă: acid sulfuric 1mM și metanol în raport de 80:20**

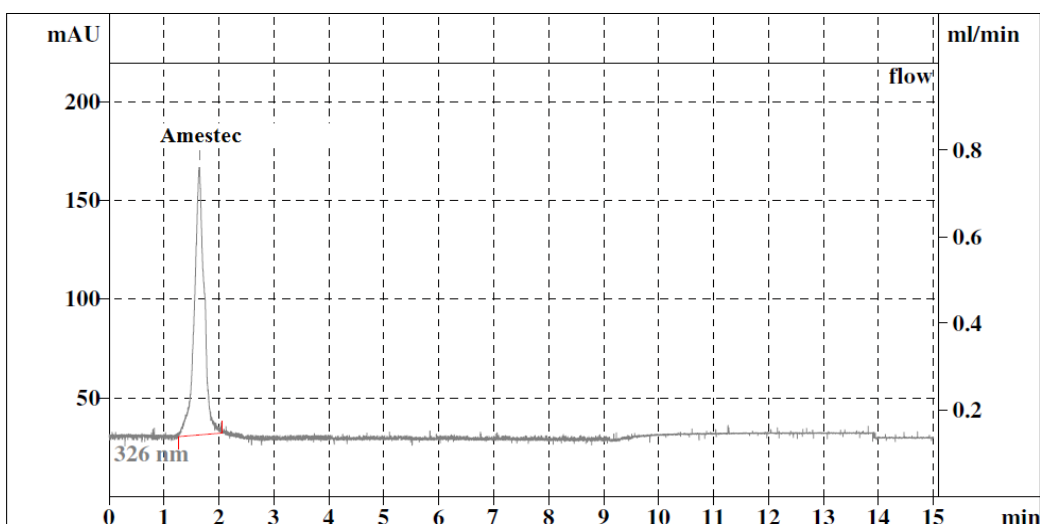


**Figura 38.** Cromatogramă obținută după injectarea nicotinei utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 80:20



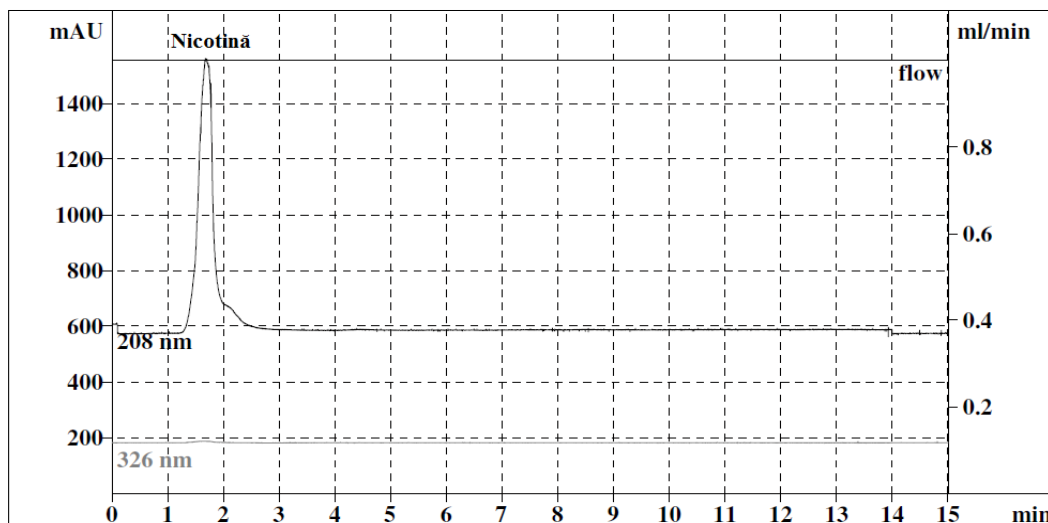


**Figura 39.** Cromatogramă obținută după injectarea de 6HNic utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 80:20

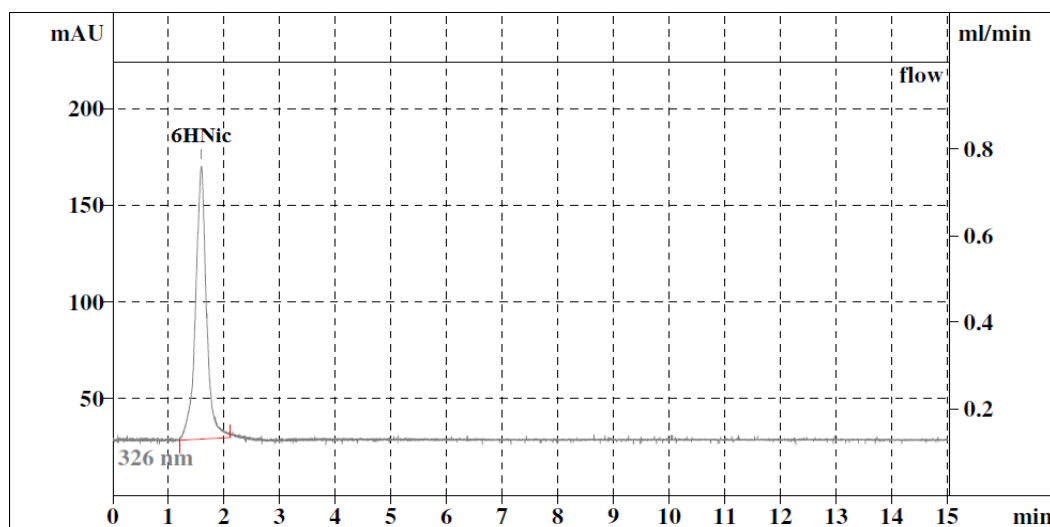


**Figura 40.** Cromatogramă obținută după injectarea amestecului utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 80:20

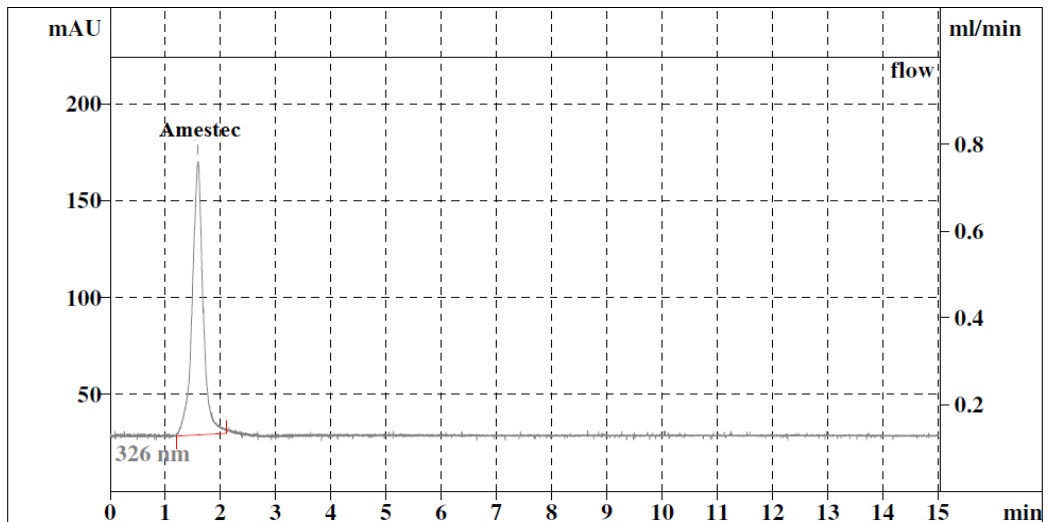
Faza mobilă: acid sulfuric 1mM și metanol în raport de 75:25



**Figura 41.** Cromatogramă obținută după injectarea nicotinei utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 75:25

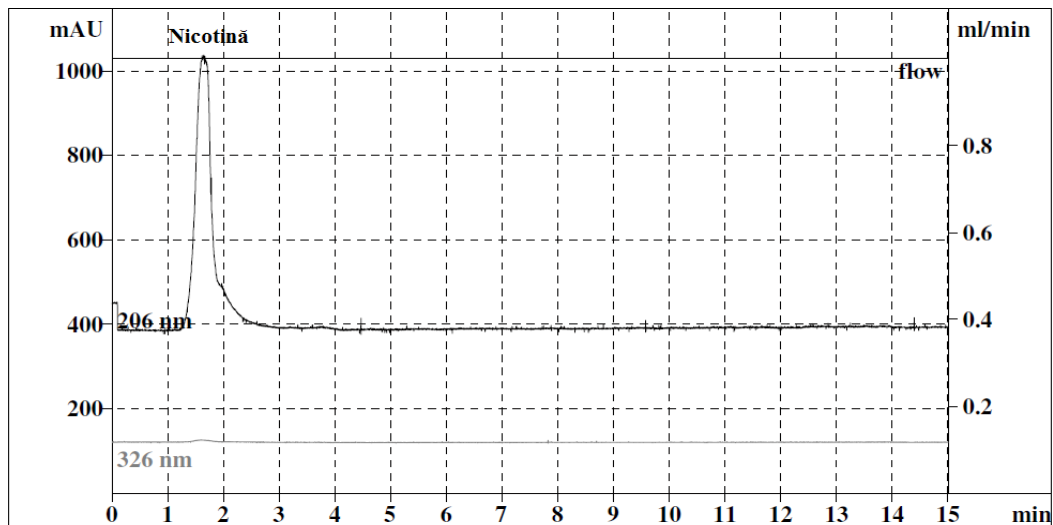


**Figura 42.** Cromatogramă obținută după injectarea de 6HNic utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 75:25

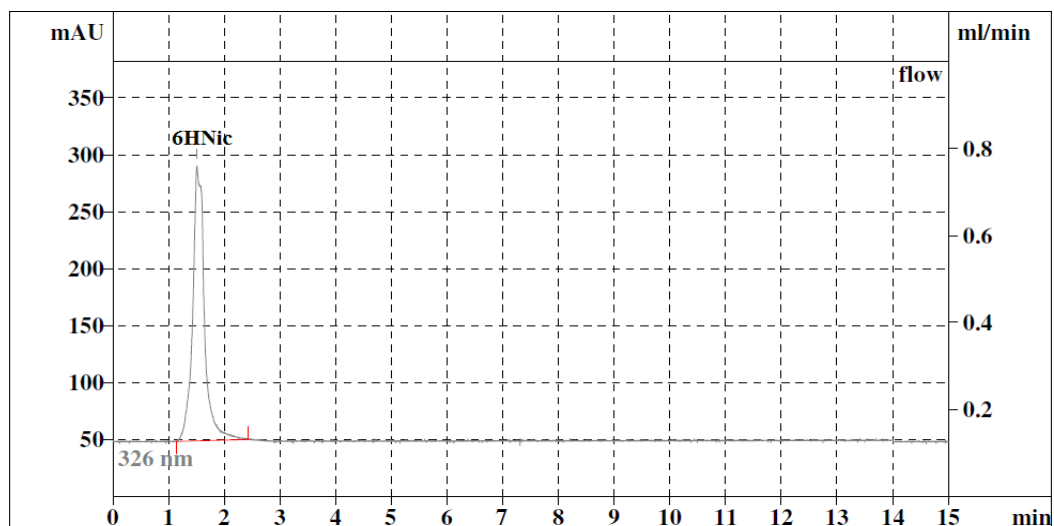


**Figura 43.** Cromatogramă obținută după injectarea amestecului utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 75:25

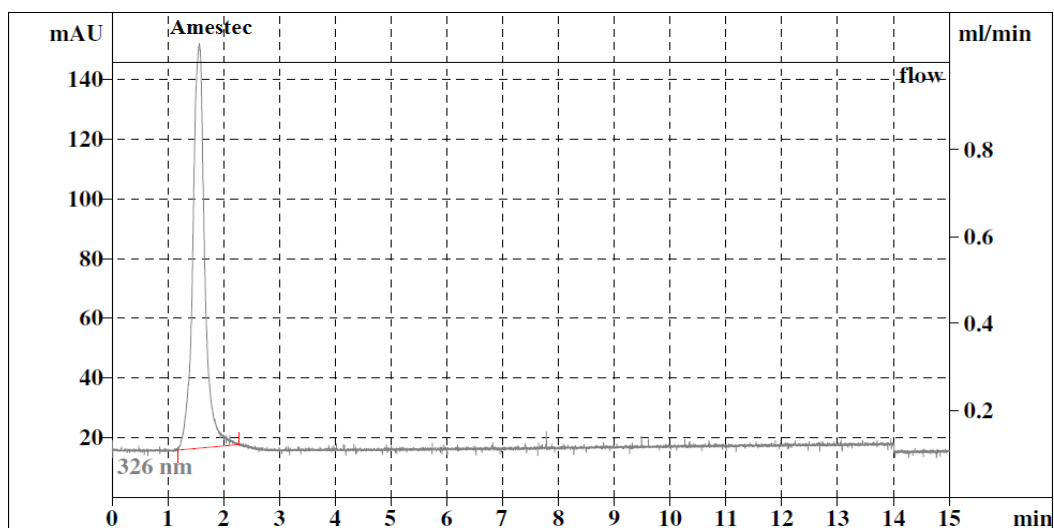
**Faza mobilă: acid sulfuric 1mM și metanol în raport de 70:30**



**Figura 44.** Cromatogramă obținută după injectarea nicotinei utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 70:30



**Figura 45.** Cromatogramă obținută după injectarea de 6HNic utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 70:30



**Figura 46.** Cromatogramă obținută după injectarea amestecului utilizând ca fază mobilă acid sulfuric 1mM și metanol în raport 70:30

## BIBLIOGRAFIE

1. **Andrei, A., Mihășan, M.** (2013): *Molecular gene cloning of nicotine-dehydrogenase from the pAO1 megaplasmid of Arthrobacter nicotinovorans*. Analele Științifice Ale Universității “Alexandru Ioan Cuza” Din Iași Sec. II A. Genetică Și Biologie Moleculară, 14(3), 15–20.
2. **Beckman Coulter®** (2005): *The Affordable Spectrophotometry Solution for Life Science, Research and Analytical Labs*. Accesat pe data de 13.05.2015 de pe pagina web: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=BR-10028A.pdf>
3. **Borda, C.** (2006): *Alzheimer's Disease and Memory Drugs* (pp.15-16). (D. J. Triggle, Ed.). New York: Infobase Publishing.
4. **Brandsch, R.** (2006): *Microbiology and biochemistry of nicotine degradation*. Applied Microbiology and Biotechnology, 69(5), 493–498.
5. **Brandsch, R., Decker, K.** (1984): *Isolation and partial characterization of plasmid DNA from Arthrobacter oxidans*. Archives of Microbiology, 138(1), 15–17.
6. **Busse H. J., Wieser, M.** (2014): The Genus Arthrobacter. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 105–132). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
7. **Chiribau, C. B., Mihășan, M., Ganas, P., Igloi, G. L., Artenie, V., Brandsch, R.** (2006): *Final steps in the catabolism of nicotine*. The FEBS Journal, 273(7), 1528–1536.
8. **Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., ... Tiedje, J. M.** (2009): *The Ribosomal Database Project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis*. Nucleic Acids Research, 37(7), 141–145.
9. **Covic M., Ștefănescu D., Sandovici, I.** (2004): Structura, analiza și localizarea genelor. In *GENETICĂ MEDICALĂ* (pp. 67–68). Iași: Polirom.
10. **Crooks, P. A.** (1999): Chemical properties of nicotine and other tobacco-related compounds. In J. Gorrod & P. Jacob (Eds.), *Analytical Determination of Nicotine and Related Compounds and their Metabolites*, (pp. 91–92). Elsevier.
11. **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, 236–248.
12. **Gilbert, T. M.** (2013): *High performance liquid chromatography* (pp. 12-56). *Chromatographia* (Vol. 44). Wright.
13. **Gurusamy, R., Natarajan, S.** (2013): *Current status on biochemistry and molecular biology of microbial degradation of nicotine*. The Scientific World Journal, 2013, Article ID 125385.
14. **Hochstein, L. Rittenberg, S.** (1958). *I. Nicotine oxidation by cell-free preparations*. The Journal of Biological Chemistry, The Bacter, 151–155.
15. **Hochstein, L. Rittenberg, S.** (1958): *II. The isolation of the first oxidative product and its identification as (l)-6-hydroxynicotine*. The Journal of Biological Chemistry, The Bacter, 156–161.
16. **Hrițcu, L., Ciobică, A., Gorgan, L.** (2009): *Nicotine-induced memory impairment by increasing brain oxidative stress*. Central European Journal of Biology, 4(3), 335–342.
17. **Hrițcu, L., Ștefan, M., Brandsch, R., Mihășan, M.** (2013): *6-hydroxy-l-nicotine from Arthrobacter nicotinovorans sustain spatial memory formation by decreasing brain oxidative stress in rats*. Journal of Physiology and Biochemistry, 69(1), 25–34.

18. Hrițcu, L., Ștefan, M., Brandsch, R., Mihășan, M. (2015): *Enhanced behavioral response by decreasing brain oxidative stress to 6-hydroxy-L-nicotine in Alzheimer's disease rat model*. Neuroscience Letters, 1–7.
19. Igloi, G. L., Brandsch, R. (2003): *Sequence of the 165-Kilobase Catabolic Plasmid pAOI from Arthrobacter nicotinovorans and Identification of a pAOI-Dependent Nicotine Uptake System*. Journal of Bacteriology, 185(6), 1976–1986.
20. Jones D., Keddie, R. M. (2006). The Genus Arthrobacter. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 945–960). New York, NY: Springer New York.
21. Keddie, R. M., Collins, M. D., Jones, D. (1986): Genus Arthrobacter. In *Bergey's manual of systematic bacteriology Volume 2* (pp. 1288–1300).
22. Kodama, Y., Yamamoto, H., Amano, N., Amachi, T. (1992): *Reclassification of two strains of Arthrobacter oxydans and proposal of Arthrobacter nicotinovorans sp. nov.* International Journal of Systematic Bacteriology, 42(2), 234–239.
23. Lebbe, E. K. M., Peigneur, S., Wijesekara, I., Tytgat, J. (2014): *Conotoxins targeting nicotinic acetylcholine receptors: an overview*. Marine Drugs, 12(5), 2970–3004.
24. Liu, Y., Wang, L., Huang, K., Wang, W., Nie, X., Jiang, Y., ... Tang, H. (2014): *Physiological and biochemical characterization of a novel nicotine-degrading bacterium Pseudomonas geniculata NI*. PloS One, 9(1), e84399.
25. Loveland-Curtze, J., Sheridan, P. P., Gutshall, K. R., Brenchley, J. E. (1999): *Biochemical and phylogenetic analyses of psychrophilic isolates belonging to the Arthrobacter subgroup and description of Arthrobacter psychrolactophilus, sp. nov.* Archives of Microbiology, 171(6), 355–363.
26. Ma, Y., Wei, Y., Qiu, J., Wen, R., Hong, J., Liu, W. (2014): *Isolation, transposon mutagenesis, and characterization of the novel nicotine-degrading strain Shinella sp. HZN7*. Applied Microbiology and Biotechnology, 98(6), 2625–2636.
27. Macherey-Nagel (n.d.): *NUCLEODUR® C18ec*. Accesat pe 13.05.2015 de pe pagina: [ftp://ftp.mn-net.com/english/Flyer\\_Catalogs/Chromatography/HPLC/NUCLEODUR\\_C18ec.pdf](ftp://ftp.mn-net.com/english/Flyer_Catalogs/Chromatography/HPLC/NUCLEODUR_C18ec.pdf)
28. Macherey-Nagel (n.d.): *NUCLEODUR® RP columns*: Accesat 13.05.2015: [ftp://ftp.mn-net.com/english/Instruction\\_leaflets/Chromatography/HPLC/NUCLEODUR\\_RP\\_A041165\\_EN.pdf](ftp://ftp.mn-net.com/english/Instruction_leaflets/Chromatography/HPLC/NUCLEODUR_RP_A041165_EN.pdf)
29. Mallik B., Chakravarti B, Chakravarti, D. N. (2008): Overview of Chromatography. In S. R. Gallagher & E. A. Wiley (Eds.), *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* (pp. 6.1.1–6.1.22). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
30. Megharaj, M., Avudainayagam, S., Naidu, R. (2003): *Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste*. Current Microbiology, 47(1), 51–54.
31. Meyer, V. (2004): *Practical High-performance Liquid Chromatography*. John Wiley and Sons.
32. Mihășan, M. (2011): *Megaplasmidul pAOI+ - Structură și Funcție* (pp. 9-48). Editura Universității Alexandru Ioan Cuza din Iași.
33. Mihășan, M., Căpățînă, L., Neagu, E., Ștefan, M., Hrițcu, L. (2013): *In-silico identification of 6-hydroxy-L-nicotine as a novel neuroprotective drug*. Romanian Biotechnological Letters, 18(3), 8333–8340.
34. Mihășan M., Ștefan M., Olteanu, Z. (2012): *Biologie Moleculară* (pp. 48-50). Iași: Editura Universității Alexandru Ioan Cuza din Iași.
35. Nakano, H., Wieser, M., Hurh, B., Kawai, T., Yoshida, T., Yamane, T., Nagasawa, T. (1999): *Purification, characterization and gene cloning of 6-hydroxynicotinate 3-monooxygenase from Pseudomonas fluorescens TN5*. European Journal of Biochemistry, 260(1), 120–126.

36. **Noctor, T.** (1995): Instrumentation: pumps, injectors and column design. In *High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice* (pp. 97–106). CRC Press.
37. **Sandu, C., Chiribau, C. B., Sachelaru, P., Brandsch, R.** (2005): *Plasmids for nicotine-dependent and -independent gene expression in Arthrobacter nicotinovorans and other Arthrobacter species*. Applied and Environmental Microbiology, 71(12), 8920–8924.
38. **Schleifer, K. H., Kandler, O.** (1972). *Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications*. Bacteriological Reviews, 36(4), 407–477.
39. **Schmid A., Dordick J. S. , Hauer B. , Kiener A., Wubbolts, M., Witholt, B.** (2001): *Industrial biocatalysis today and tomorrow*. Nature, 409(6817), 258–268.
40. **Spande, T. F., Garraffo, H. M., Edwards, M. W., Yeh, H. J. C., Pannell, L., Daly, J. W.** (1992): *Epibatidine: a novel (chloropyridyl)azabicycloheptane with potent analgesic activity from an Ecuadoran poison frog*. Journal of the American Chemical Society, 114(9), 3475–3478.
41. **Stackebrandt, E., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L.** (1997): *Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov.* International Journal of Systematic Bacteriology, 47(2), 479–491.
42. **Tang, H., Wang, L., Meng, X., Lanying, M., Wang, S., He, X., ... Xu, P.** (2009): *Novel nicotine oxidoreductase- encoding gene involved in nicotine degradation by pseudomonas putida strain S16*. Applied and Environmental Microbiology, 75(3), 772–778.
43. **Tang, H., Wang, S., Ma, L., Meng, X., Deng, Z., Zhang, D., ... Xu, P.** (2008): *A novel gene, encoding 6-hydroxy-3-succinoylpyridine hydroxylase, involved in nicotine degradation by Pseudomonas putida strain S16*. Applied and Environmental Microbiology, 74(5), 1567–1574.
44. **Tofan Lavinia, Bulgariu Laura, Toma, O.** (2009): *Biochimie analitica, vol. II - Aplicatiile biologice ale biosenzorilor* (pp. 97-98). CASA EDITORIALA DEMIURG PLUS.
45. **Wang, S., Huang, H., Xie, K., Xu, P.** (2012): *Identification of nicotine biotransformation intermediates by Agrobacterium tumefaciens strain S33 suggests a novel nicotine degradation pathway*. Applied Microbiology and Biotechnology, 95(6), 1567–1578.
46. **Wang, S. N., Xu, P., Tang, H. Z., Meng, J., Liu, X. L., Ma, C. Q.** (2005): *“Green” route to 6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine from (S)-nicotine of tobacco waste by whole cells of a Pseudomonas sp.* Environmental Science and Technology, 39(17), 6877–6880.
47. **Wauters, G., Charlier, J., Janssens, M., Delmee, M.** (2000): *Identification of Arthrobacter oxydans, Arthrobacter luteolus sp. nov., and Arthrobacter albus sp. nov., Isolated from Human Clinical Specimens*. J. Clin. Microbiol., 38(6), 2412–2415.





## LUCRĂRI PUBLICATE/PREzentATE ÎN URMA ACESTUI STUDIU

### Lucrări publicate în extenso:

1. **BOIANGIU Răzvan Ștefan**, GUZUN Doina, MIHĂȘAN Marius (2014), Time dependent accumulation of nicotine derivatives in the culture medium of *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, Analele Științifice ale Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași, Secțiunea II a, Genetică și Biologie Moleculară, 15(4), pag 19-23;

### Lucrări publicate în rezumat:

2. GUZUN Doina, **BOIANGIU Răzvan Ștefan**, MIHĂȘAN Marius (13-14 Mai 2015), Dinamica acumulării derivaților nicotiniici în mediile de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, Sesiunea națională de comunicări științifice studentești, Rezumatele comunicărilor: Științe ale naturii și exacte, Universitatea de Stat din Moldova, pag 3-4;

### Lucrări prezentate la conferințe științifice:

3. **BOIANGIU Răzvan Ștefan**, GUZUN Doina, MIHĂȘAN Marius, Time dependent accumulation of nicotine derivatives in the culture medium of *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, 1<sup>st</sup> edition "Young Researchers in BioScience – International Symposium", Cluj-Napoca, România 23-27 Iulie 2014;
4. GUZUN Doina, **BOIANGIU Răzvan Ștefan**, MIHĂȘAN Marius, Dinamica acumulării derivaților nicotiniici 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;
5. GUZUN Doina, **BOIANGIU Răzvan Ștefan**, MIHĂȘAN Marius, Dinamica acumulării derivaților nicotiniici în mediile de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, **Sesiunea națională de comunicări științifice studentești, Ediția a XIX-a, Etapa a I-a, USM, Chișinău, R. Moldova 17 Martie 2015 (PREMIUL I);**
6. GUZUN Doina, **BOIANGIU Răzvan Ștefan**, MIHĂȘAN Marius, Dinamica acumulării derivaților nicotiniici în mediile de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, **Sesiunea națională de comunicări științifice studentești, Ediția a XIX-a, Etapa a II-a, USM, Chișinău, R. Moldova 13-14 Mai 2015 (PREMIUL III).**