



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00462**

(22) Data de depozit: **29/07/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/01/2024 BOPI nr. 1/2024

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN
CUZA" DIN IAȘI, BD. CAROL I NR. 11, IAȘI,
IS, RO

(72) Inventatori:
• MIHĂȘAN MARIUS, STR.TABACULUI,
NR.47, BL.Y4, ET.4, AP.4, IAȘI, IS, RO;

• ȘTEFAN MARIUS,
BD.TUDOR VLADIMIRESCU, NR.6, BL.P13,
SC.C, IAȘI, IS, RO;
• CHISCĂRI CARMEN MIHAELA, VORONA,
BT, RO;
• PAIU ANDREEA MIHAELA, STR.ȘCOLII,
NR.83, PLOPENI, SV, RO;
• BABII CORNELIA, ALEEA
PROF.I.P.CULIANU, NR.11A, IAȘI, IS, RO

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A DERIVATULUI
6-HIDROXI-(S)-NICOTINĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a derivatului 6-hidroxi-(S)-nicotină (termen sinonim cu 6HLN) cu aplicații în biotehnologie. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: cultivare tulpinii *Paenarthrobacter nicotinovorans* NCAIM P(B) 001499 (derivată de la *P. nicotinovorans* pAO1 ATTC 49919 și supraexprimând enzima NDH) într-un bioreactor cu aerare și agitare controlată pe un mediu de creștere conținând ca sursă de C, L-nicotină ca precursor pentru 6HLN și introducerea în mediul de cultură a unui

inhibitor chimic pentru 6-hidroxi-nicotin-oxidază (6HLNO) de tip $ZnSO_4$ pentru reducerea randamentului de transformare a 6HLN în 6-hidroxi-pseudoxi-nicotină, rezultând acumularea derivatului 6-hidroxi-(S)-nicotină în concentrații de până la 2,5 mM într-un interval de 20...35 h de la cultivare.

Revendicări: 4
Figuri: 3



Procedeu de obținere a derivatului 6-hidroxi-(S)-nicotină

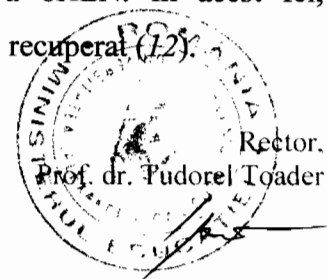
39

Invenția se referă la o nouă metodă de obținere a derivatului 6-hidroxi-(S)-nicotină (termen sinonim cu 6-hidroxi-(L)-nicotină) folosind tulpina *Paenarthrobacter nicotinovorans* NCAIM P(B) 001499 și se încadrează în domeniul biotehnologiei.

Compusul 6-hidroxi-(L)-nicotină (6HLN) este primul intermediar metabolic din calea de degradare a nicotinei ce funcționează în microorganismul *Paenarthrobacter nicotinovorans* pAO1 ATCC 49919 (1). Datorită similarităților structurale cu nicotina, 6HLN are capacitatea de a interacționa cu receptorii nicotiniци pentru acetil-colină (nAChR) și le poate modula funcționarea (2, 3). 6HLN se leagă de nAChR cu o afinitate mai mare decât a nicotinei și de asemenea, se presupune că ar avea un timp de înjumătățire sensibil superior față de cel al nicotinei. Testele experimentale realizate pe animale de laborator au demonstrat că 6HLN are o capacitate crescută de a susține memoria și de a îmbunătăți răspunsul comportamental prin reducerea stresului oxidativ la nivelul creierului (4). Administrarea de 6HLN la șobolani tratați în prealabil cu clorizondamină în scopul simulării unui model de Alzheimer a demonstrat că acest compus poate reduce stările de anxietate și depresie (5, 6).

6HLN reprezintă de asemenea un precursor important ce ar putea fi folosit pentru sinteza de piridine mono- sau di-substituite cu activități biologice importante, precum insecticidul Imidacloprid, compusul anti-Parkinson SIB-1508Y sau analogi ai compusului analgezic Epibatină (7). Suplimentar, descrierea unui sistem de control al expresiei genelor în culturi de celule de mamifere bazat pe 6HLN (8) și cunoscutele sale efecte antimicrobiene (9, 10) indică o potențială creștere a cererii pentru 6HLN în special în industria farmaceutică și chimică. O metodă simplă, rapidă și ieftină de obținere a 6HLN este deci necesară și utilă.

6HLN a fost până în prezent obținut prin sinteza chimică ce are la bază reacția de diazotare a 6-aminonicotinei urmată de o reacție de hidroliză (11). O metodă bazată pe conversia microbiologică a nicotinei din deșeuri provenite din industrie în 6HLN utilizând tulpina *Arthrobacter oxidans* $\alpha 2$ face obiectul brevetului cu numărul US3230226A (10). O altă metodă bazată pe aceleași principii ale biocatalizei a fost recent descrisă și se bazează pe tulpina *Agrobacterium tumefaciens* S33. Această tulpină a fost modificată genetic prin inactivarea unei gene ce codifică enzima responsabilă de transformarea 6HLN în 6-hidroxi-N-metil-miosmină, împiedicându-se astfel metabolizarea completă a 6HLN. În acest fel, compusul 6HLN se acumulează în mediul de cultură de unde poate fi recuperat (12).



Metodele de obținere a compușilor chimici utili ce au la bază procesele de bioconversie prezintă o serie întregă de avantaje legate de prețul de cost, sustenabilitate, disponibilitate, diminuarea poluării mediului înconjurător, etc. Cu toate acestea, în cazul producerii de intermediari metabolici folosind microorganisme apar frecvent dificultăți tehnice deoarece produșii de interes sunt metabolizați pe diferite căi metabolice ceea ce face foarte dificilă acumularea și izolarea compusului de interes. O situație asemănătoare se înregistrează și în cazul producerii de 6HLN pornind de la nicotină. Metabolizarea acestui alcaloid se poate realiza la bacterii pe calea pirolidinică ce debutează cu hidroxilarea nicotinei în poziția 6' de către enzima nicotin-dehidrogenază cu formarea de 6HLN – produsul de interes (13). În etapa imediat următoare inelul pirolidinic este dehidrogenat în poziția 2-3 de către enzima 6-hidroxi-nicotin-oxidază. Legătura dublă suplimentară din poziția 2-3 destabilizează inelul pirolidinic și acesta suferă o reacție de hidroliză spontană. Compusul 6-hidroxi-pseudoxi-nicotină format este convertit mai departe de o suită de oxidoreductaze ce diferă de la o specie la alta în intermediari ai ciclului Krebs și 4,4',5,5'-tetrahidroxi-3,3'-diazadifenoquinonă-(2,2'). Acest ultim compus este cunoscut sub numele de albastru de nicotină datorită culorii specifice, acumularea sa în mediul de cultură fiind utilizată ca indicator specific pentru semnalizarea prezenței și activării căii de catabolizare a nicotinei prin calea pirolidinică.

Deoarece metabolizarea nicotinei prin calea pirolidinică nu se oprește la 6HLN, **problema tehnică** legată de obținerea compusului de interes prin bioconversie folosind celule bacteriene constă în identificarea unei modalități de reducere sau stopare a transformării acestuia în 6-hidroxi-pseudoxi-nicotină. Ținând cont de observația că 6HLN se acumulează în mediul de cultură al speciei *Arthrobacter oxidans* (14), Squires și Haynes (10) propun în brevetul US3230226A monitorizarea acumulării compusului la 290 nm și stoparea reacției de biotransformare prin răcirea rapidă a culturii și acidifierea mediului până la pH 2 cu HCl. Yu *et al.* propun o abordare diferită pentru a rezolva această problemă. Utilizând ingineria genetică, aceștia modifică o tulpină de *Agrobacterium tumefaciens* S33 ce degradează nicotina folosind calea pirolidinică și inactivează gena ce codifică producerea enzimei 6-hidroxi-nicotin-oxidază (12).

În acest context, **soluția tehnică** propusă de prezenta invenție, constă în utilizarea microorganismului *Paenarthrobacter nicotinovorans* pAO1 ATCC 49919 și o strategie pentru îmbunătățirea randamentului de obținere a 6HLN ce se bazează pe creșterea nivelului de expresie a enzimei nicotin-dehidrogenază alături de reducerea ratei de conversie a acestuia în



6-hidroxi-pseudoxi-nicotină prin utilizarea unor inhibitori chimici ai 6-hidroxi-L-nicotin-oxidazei. 39

Paenarthrobacter nicotinovorans pAO1 ATCC 49919 este unul dintre primele microorganisme izolate și studiate care au capacitatea de a degrada nicotina. S-a demonstrat că întreaga cale de degradare a nicotinei este codificată de megaplasmidul pAO1 ce a fost complet secvențiat în 2003 (GenBank ID AJ507836.1) (15). Suplimentar, pentru această tulpină au fost creați vectori plasmidiali de expresie specifici ce permit controlul strict al expresiei genelor conținute (16). Ca în cazul celorlalte tulpini ce utilizează calea pirolidinică, și în *Paenarthrobacter nicotinovorans* pAO1 ATCC 49919 degradarea nicotinei debutează cu hidroxilarea nicotinei în poziția 6' de către enzima nicotin-dehidrogenază (NDH, EC 1.5.99.4) cu formarea de 6HLN. Etapa imediat următoare este catalizată de către 2 enzime diferite cu specificitate absolută de substrat: 6-hidroxi-(S)-nicotin-oxidază (6-hidroxi-(L)-nicotin-oxidază, 6HLNO, EC 1.5.3.5) dacă substratul inițial al căii este L-nicotină și 6-hidroxi-(R)-nicotin-oxidază (6-hidroxi-(D)-nicotin oxidază; 6HDNO, EC 1.5.3.6) dacă substratul inițial al căii este D-nicotină.


Soluția pentru problema tehnică indicată anterior se bazează pe:

1. creșterea randamentului catalitic cu care nicotina este transformată în 6HLN prin supraexprimarea enzimei NDH și
2. reducerea randamentului de transformare a 6HLN în 6-hidroxi-pseudoxi-nicotină prin introducerea în mediul de cultură a unui inhibitor pentru 6-hidroxi-nicotin-oxidază.

Propriu-zis, metoda de obținere a 6HLN este caracterizată prin cultivarea tulpinii *Paenarthrobacter nicotinovorans* NCAIM P(B) 001499 (tulpină derivată de la *P. nicotinovorans* pAO1 ATCC 49919 și supraexprimând enzima NDH) într-un biofermentator cu aerare și agitare controlată pe un mediu de creștere ce conține citrat ca sursă de C, L-nicotină ca precursor pentru 6HLN și ZnSO₄ ca inhibitor chimic al 6HLNO.

Avantajele invenției în raport cu celelalte două soluții tehnice se referă la viteza de acumulare a 6HLN și la stabilitatea genetică a tulpinii utilizate. Astfel, metoda ce face obiectul patentului US3230226A presupune timpi de conversie ce variază între 43-72 ore, în timp ce prin metoda curentă se produce cantitatea maximă de 6HLN în 20-25 ore. De asemenea, prin utilizarea vectorului pART2 în care NDH este exprimată intrinsec se pot scurta suplimentar timpii necesari de la adăugarea nicotinei până la obținerea 6HLN (nu se adaugă L-nicotina la inocularea culturii, ci după ce aceasta atinge o vârstă optimă și acumulează suficient NDH).

Prof. dr. Tudor Stăder



Utilizarea inhibitorului ZnSO₄ pentru reducerea activității catalitice a 6HLNO are avantajul nealterării mecanismelor genetice de reglaj a activității tuturor genelor implicate în degradarea nicotinei, inclusiv cele implicate în transportul nicotinei și în apărarea celulelor de efectele toxice ale acestui alcaloid. Metoda descrisă are avantajul că prin modificarea nivelului de ZnSO₄, se poate controla ce cantitate de precursor este utilizat pentru creșterea biomasei și ce cantitate este convertită în 6HLN.

Mod de realizare

Pentru obținerea tulpinii de *Paenarthrobacter nicotinovorans* NCAIM P(B) 001499, secvența de ADN de pe pAO1 dintre pozițiile 92895 și 96683 codificând cele 3 gene *ndhL*, *ndhS* și *ndhM* ale NDH a fost amplificată folosind perechea de primeri cu secvența 5'AGTGAAGGATTGATCAACCTGCTATC'3 și 5'CTCCCTGTCTCTAGAGCCGCGATC'3. Fragmentul astfel obținut a fost clonat în vectorul de expresie pART2 între situs-urile de clivare ale enzimelor BamHI/XbaI, păstrându-se cadrul de lectură și punând *ndhL* sub controlul promotorului secvenței operatoare a genei *hdnO*. Vectorul modificat pART2*ndhLSM* a fost apoi transferat prin electroporare în tulpina *Paenarthrobacter nicotinovorans* pAO1 ATCC 49919.

Tulpina obținută ce supraexprimă NDH intrinsec se cultivă pe mediu citrat solid (16 g/L agar, 2 g/L citrat de sodiu; 2 g/L (NH₄)₂SO₄; 5 g/L Na₂HPO₄; 3,06 g/L KH₂PO₄; 0,5 g/L extract de drojdie) suplimentat cu 140 μg/ml kanamicină, 0,05% L-nicotină și 0,5% soluție de minerale (0,75 g/L CaCl₂; 4,58 g/L H₃BO₃; 3,5 g/L ZnSO₄; 0,22 g/L Na₂MoO₄; 0,22 g/L FeSO₄; 0,24 g/L MnSO₄; 0,1 g/L CuSO₄; 0,1 g/L CoSO₄; 2 g/L KH₂PO₄; 20 g/L MgSO₄; 7,5 g/L EDTA). Tulpina se incubează timp de 48h la 28°C pentru dezvoltarea de colonii izolate. Una dintre colonii se folosește pentru inocularea a 10 ml mediu citrat preparat ca mai sus (exceptând agarul) și suplimentat cu 140 μg/ml kanamicină, 0,05% L-nicotină și 0,5% soluție de minerale. Cultura inocul astfel înființată se incubează la 28°C pe un agitator orbital termostat la 190 rpm pentru 48 h.

Într-un vas de fermentație de 3 L se introduc 2 L de mediu citrat preparat ca anterior și suplimentat cu 70 (140) μg/ml kanamicină, 0,05% L-nicotină, 2 ml ulei vegetal steril, 0,5% soluție de minerale (17) și după caz, ZnSO₄ până la 1mM. Cultura se inițiază prin inocularea mediului cu 1 ml din inoculul având vârsta de 48h și se incubează la temperatura de 28°C și nivel de agitație de 5Hz folosind fermentatorul Lambda Minifor. Nivelul de aerare se menține la 0,1-0,2 L aer/min și se prelevează probe la fiecare oră. Nivelul de nicotină se acumulează

Prof. dr. Tudorel Toader



6HLN se monitorizează prin HPLC folosind o coloană C18 și un detector UV-VIS la $\lambda=250$ nm pentru nicotină și respectiv $\lambda=290$ nm pentru 6HLN. Acumularea maximă de nicotină se poate observa în intervalul 18-40 ore de la inoculare.

35

Exemplul 1. Producerea de 6HLN folosind *Paenarthrobacter nicotinovorans* pAO1 ATCC 49919

Se înființează o precultură pe 10 ml de mediu citrat suplimentat cu kanamicină 70, 0,05% nicotină și 5% soluție de minerale prin inocularea cu o colonie de *Paenarthrobacter nicotinovorans* pAO1 wt având vârsta de 48h. Precultura se incubează pe un agitator orbital la 190 rpm timp de 48h la 28°C pentru atingerea fazei staționare de creștere. Cultura principală se înființează prin inocularea cu 2 ml de precultură a 2 L de mediu citrat suplimentat cu 2 ml ulei vegetal steril, kanamicină 70 mg/ml, 0,05% nicotină, 5% și soluție de minerale (17) preîncălzit la 28°C și saturat în O₂. Imediat după inoculare se pornește procesul de fermentație la temperatura de 28°C prin alimentarea vasului cu aer (0,1 sau 0,2 l/min), monitorizarea pH-ului și cantității de O₂ dizolvat. La intervale de 60 min se prelevează probe de 1 ml de mediu pentru monitorizarea densității celulare și a producției de pigment albastru de nicotină folosind un spectrofotometru, respectiv a nivelurile de nicotină și 6HNLN folosind cromatografia HPLC în fază inversată.

Un exemplu tipic al dinamicii acumulării 6HNic în mediul de cultură este prezentat în figura 1. După cum se poate observa, nivelul de aerare utilizat nu influențează semnificativ nivelul de acumulare a 6HLN, în ambele cazuri compusul de interes atingând niveluri de aprox. 1.5 mM. O aerare mai intensă duce la întârzieri în creșterea culturii, cu obținerea unei perioade de lag mai mare și corespunzător o apariție întârziată a 6HLN și a pigmentului albastru. Se observă o corelație foarte bună între nivelul de O₂ dizolvat, pH-ul mediului de reacție și punctul de maxim al nivelului 6HNLN: atingerea nivelului maxim de acumulare a 6HLN este simultană cu o inflexiune în curba de variație a pH-ului și un peak ușor de remarcat în curba de variație a O₂ dizolvat. Această sincronizare ușurează foarte mult aplicarea acestei tehnologii de producere a 6HLN la nivel industrial, nefiind astfel necesară monitorizarea 'off-line' prin HPLC a acumulării produsului de interes deoarece punctul maxim de acumulare este identificabil 'on-line', direct din panoul de comandă al biofermentatorului.

Exemplul 2. Producerea de 6HLN folosind tulpina *Paenarthrobacter nicotinovorans* NCAIM P(B) 001499



Prof. Tudor Loagher

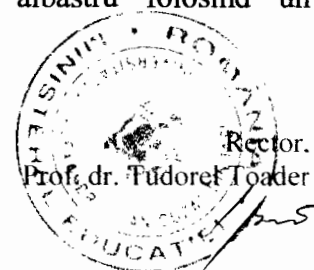
34

Se înființează o precultură în 10 ml de mediu citrat suplimentat cu kanamicină 70 mg/ml, 0,05% nicotină și 5% soluție de minerale prin inocularea cu o colonie de *Paenarthrobacter nicotinovorans* NCAIM P(B) 001499 de pe o placă având vârsta de 48h. Precultura se incubează pe un agitator orbital la 190 rpm timp de 48h la 28°C pentru atingerea fazei staționare de creștere. Cultura principală se înființează prin inocularea cu 2 ml de precultură a 2 L de mediu citrat suplimentat cu 2 ml ulei vegetal steril, kanamicină 140 microg/ml, 0,05% nicotină, 5% și soluție de minerale (17) preîncălzit la 28°C și saturat în O₂. Imediat după inoculare se pornește procesul de fermentație la temperatura de 28°C prin alimentarea vasului cu aer (0,1 sau 0,2 l/min), monitorizarea pH-ului și cantității de O₂ dizolvat. La intervale de 60 min se prelevează probe de 1 ml de mediu pentru monitorizarea densității celulare și a producției de pigment albastru folosind un spectrofotometru și a nivelurilor de nicotină și 6HLN folosind cromatografia HPLC în fază inversată.

Un exemplu tipic al dinamicii acumulării 6HLN în mediul de cultură al tulpinii *Paenarthrobacter nicotinovorans* NCAIM P(B) 001499 este prezentat în figura 2. Nivelul de aerare influențează semnificativ dinamica acumulării compusului de interes 6HLN în acest caz. La un debit de 0,2 L aer/min, cantitatea maximă de 6HLN acumulată este similară cu cea din tulpina wt de aprox. 1,5 mM. La un debit de 0,1 L aer / min, compusul de interes se acumulează într-o concentrație de până la 2,5 mM. 6HLN se acumulează însă mai târziu, corelat cu o întârziere în creștere și cu o diminuarea ratei de metabolizare a nicotinei. Aceeași legătură strictă între nivelul de O₂ dizolvat, pH-ul mediului de reacție și punctul de maxim al nivelului 6HLN indicate la exemplul 1 se poate observa și în cazul acestei tulpini.

Exemplul 3. Producerea de 6HLN folosind tulpina *Paenarthrobacter nicotinovorans* NCAIM P(B) 001499 și inhibitori chimici ai 6HLNO

Se procedează identic ca în exemplul 2 pentru pregătirea preculturii, însă cultura principală se înființează prin inocularea cu 2 ml de precultură a 2 L de mediu citrat preîncălzit la 28°C și saturat în O₂ suplimentat cu 2 ml ulei vegetal steril, kanamicină 140 microg/ml, 0,05% nicotină, 5% soluție de minerale (17) și inhibitori chimici ai 6HLNO precum HgCl₂ sau ZnSO₄ în concentrații de până la 0,2 mM. Imediat după inoculare se pornește procesul de fermentație la temperatura de 28°C prin alimentarea vasului cu aer (0,1 L aer/min), monitorizarea pH-ului și cantității de O₂ dizolvat. La intervale de 60 min se prelevează probe de 1 ml de mediu pentru monitorizarea densității celulare și a producției de pigment albastru folosind un



spectrofotometru și a nivelurilor de nicotină și 6HLN folosind cromatografia HPLC în fază inversată. 33

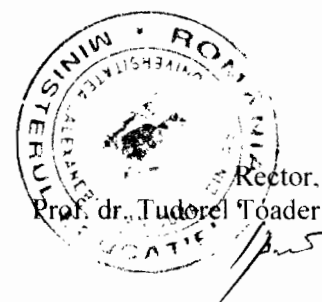
Un exemplu tipic al dinamicii acumulării 6HLN în mediul de cultură al tulpinii *Paenarthrobacter nicotinovorans* NCAIM P(B) 001499 în prezența unor concentrații variabile (0.1 – 0.2 mM) de ZnSO₄ este prezentat în figura 3. Prezența compusului ZnSO₄ influențează semnificativ dinamica acumulării compusului de interes 6HLN. Astfel, deși nu se ating nivele semnificativ mai mari ale 6HLN comparativ cu creșterea tulpinii pe mediu lipsit de inhibitor (Figura 2), perioada de timp în care compusul se acumulează în mediu la concentrații mai mari de 0,5 mM este semnificativ mărită. În lipsa inhibitorului ZnSO₄, compusul 6HLN se acumulează după 20 ore post-inoculare și nu mai este detectabil după 35 ore post-inoculare. În prezența ZnSO₄ într-o concentrație de 0.1 mM, 6HLN începe să se acumuleze în mediul de cultura ceva mai devreme, însă este decelabil în mediul de cultură și la 55 ore post-inoculare. Aceeași legătură strictă între nivelul de O₂ dizolvat, pH-ul mediului de reacție și punctul de maxim al nivelului 6HLN indicate în exemplele 1 și 2 se poate observa și în cazul cultivării pe medii ce conțin 0.1 mM ZnSO₄. Mai mult decât atât, nivelele crescute de 6HLN pe un interval mai lung de timp par să fie corelate cu revenirea mult mai înceată a cantității de O₂ dizolvat disponibil. Creșterea concentrației de inhibitor până la 0.2 mM are un efect negativ asupra nivelelor de acumulare a 6HLN, dar cultura atinge nivele mărite de densitate celulară.



Bibliografie

32

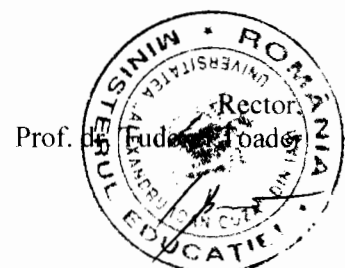
1. R. Brandsch, Microbiology and biochemistry of nicotine degradation. *Appl Microbiol Biotechnol.* **69**, 493–498 (2006).
2. L. Hritcu, M. Stefan, R. Brandsch, M. Mihasan, 6-hydroxy-L-nicotine from *Arthrobacter nicotinovorans* sustain spatial memory formation by decreasing brain oxidative stress in rats. *J. Physiol. Biochem.* **69**, 25–34 (2013).
3. M. Mihasan, L. Capatina, E. Neagu, M. Stefan, L. Hritcu, In-silico identification of 6-hydroxy-L-nicotine as a novel neuroprotective drug. *Rom. Biotechnol. Lett.* **18**, 8333–8340 (2013).
4. L. Hritcu, M. Stefan, R. Brandsch, M. Mihasan, Enhanced behavioral response by decreasing brain oxidative stress to 6-hydroxy-l-nicotine in Alzheimer's disease rat model. *Neurosci. Lett.* **591**, 41–47 (2015).
5. R. Ioniță *et al.*, 6-Hydroxy-l-nicotine effects on anxiety and depression in a rat model of chlorisondamine. *Farmacologia.* **65** (2017).
6. L. Hritcu *et al.*, Nicotine versus 6-hydroxy-l-nicotine against chlorisondamine induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus. *Biomed. Pharmacother.* **86**, 102–108 (2017).
7. T. F. Spande *et al.*, Epibatidine: a novel (chloropyridyl)azabicycloheptane with potent analgesic activity from an Ecuadoran poison frog. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 3475–3478 (1992).
8. L. Malphettes, R. G. Schoenmakers, M. Fussenegger, 6-hydroxy-nicotine-inducible multilevel transgene control in mammalian cells. *Metab. Eng.* **8**, 543–553 (2006).
9. E. Bernasek, Derivatives of 6-hydroxynicotine (1964), pp. 2–3.
10. W. C. Squires, L. E. Hayes, Synthesis of 6-hydroxynicotine (1969), (available at <https://patents.google.com/patent/US3644176A/en>).
11. P. A. Crooks, in *Analytical Determination of Nicotine and Related Compounds and Their Metabolites*, J. W. Gorrod, P. Jacob, Eds. (Elsevier, 1999; <http://books.google.com/books?id=-gyynUUv2sAC&pgis=1>), vol. 1999, p. 91.
12. W. Yu *et al.*, Green route to synthesis of valuable chemical 6-hydroxynicotine from nicotine in tobacco wastes using genetically engineered *Agrobacterium tumefaciens* S33. *Biotechnol. Biofuels.* **10**, 288 (2017).
13. R. Gurusamy, S. Natarajan, Current Status on Biochemistry and Molecular Biology of Microbial Degradation of Nicotine. *Sci. World J.* **2013**, 1–15 (2013).
14. L. I. Hochstein, S. C. Rittenberg, The bacterial oxidation of nicotine. II. The isolation of the first oxidative product and its identification as (1)-6-hydroxynicotine. *J. Biol. Chem.* **234**, 156–60 (1959).
15. G. L. Igloi, R. Brandsch, Sequence of the 165-kilobase catabolic plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and identification of a pAO1-dependent nicotine uptake system. *J. Bacteriol.* **185**, 1976–1986 (2003).
16. C. Sandu, C.-B. Chiribau, P. Sachelaru, R. Brandsch, Plasmids for nicotine-dependent and -independent gene expression in *Arthrobacter nicotinovorans* and other *arthrobacter* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8920–4 (2005).
17. K. Decker, H. Eberwein, F. Gries, M. Bruehmueller, [On the degradation of nicotine by bacterial enzymes]. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiol. Chemie.* **319**, 279–82 (1960).



Revendicări

31

1. Procedeu de obținere a derivatului 6-hidroxi-(S)-nicotină (6-hidroxi-(L)-nicotină) **caracterizată prin aceea că** se utilizează un microorganism (*Paenarthrobacter nicotinovorans* pAO1 ATCC 49919) cultivat pe un mediu ce conține o sursă de carbon, o sursă de nicotină solubilă și inhibitori chimici ai enzimei 6HLNO, capabil să degradeze nicotina folosind calea piridinică sau o altă cale similară în care sunt implicate enzimele nicotin-dehidrogenază (EC 1.5.99.4) și 6-hidroxi-(S)-nicotin-oxidază (6-hidroxi-(L)-nicotin-oxidază, 6HLNO, EC 1.5.3.5).
2. Procedeu de obținere a derivatului 6-hidroxi-(S)-nicotină (6-hidroxi-(L)-nicotină) **caracterizată prin aceea că** microorganismul *Paenarthrobacter nicotinovorans* NCAIM P(B) 001499 este modificat genetic prin clonarea în vectori de expresie a genelor enzimei nicotin-dehidrogenază (EC 1.5.99.4) provenind de la *Paenarthrobacter nicotinovorans* pAO1 ATCC 49919.
3. Procedeu de obținere a derivatului 6-hidroxi-(S)-nicotină (6-hidroxi-(L)-nicotină) conform revendicării 1 și 2 **caracterizată prin aceea că** utilizează un bioreactor pentru cultivare, la un nivel de aerare cuprins între 0,1 și 0,2 L aer/min, un nivel agitație de 5Hz, temperatură 28°C, cu acumularea derivatului 6-hidroxi-(S)-nicotină în concentrații de până la 2,5 mM într-un interval de 20-35 ore de cultivare.
4. Procedeu de obținere a derivatului 6-hidroxi-(S)-nicotină (6-hidroxi-(L)-nicotină) conform revendicării dependente 3 **caracterizată prin aceea că** inhibitorul chimic al enzimei 6HLNO este ZnSO₄ în concentrații cuprinse între 0 – 1 mM.



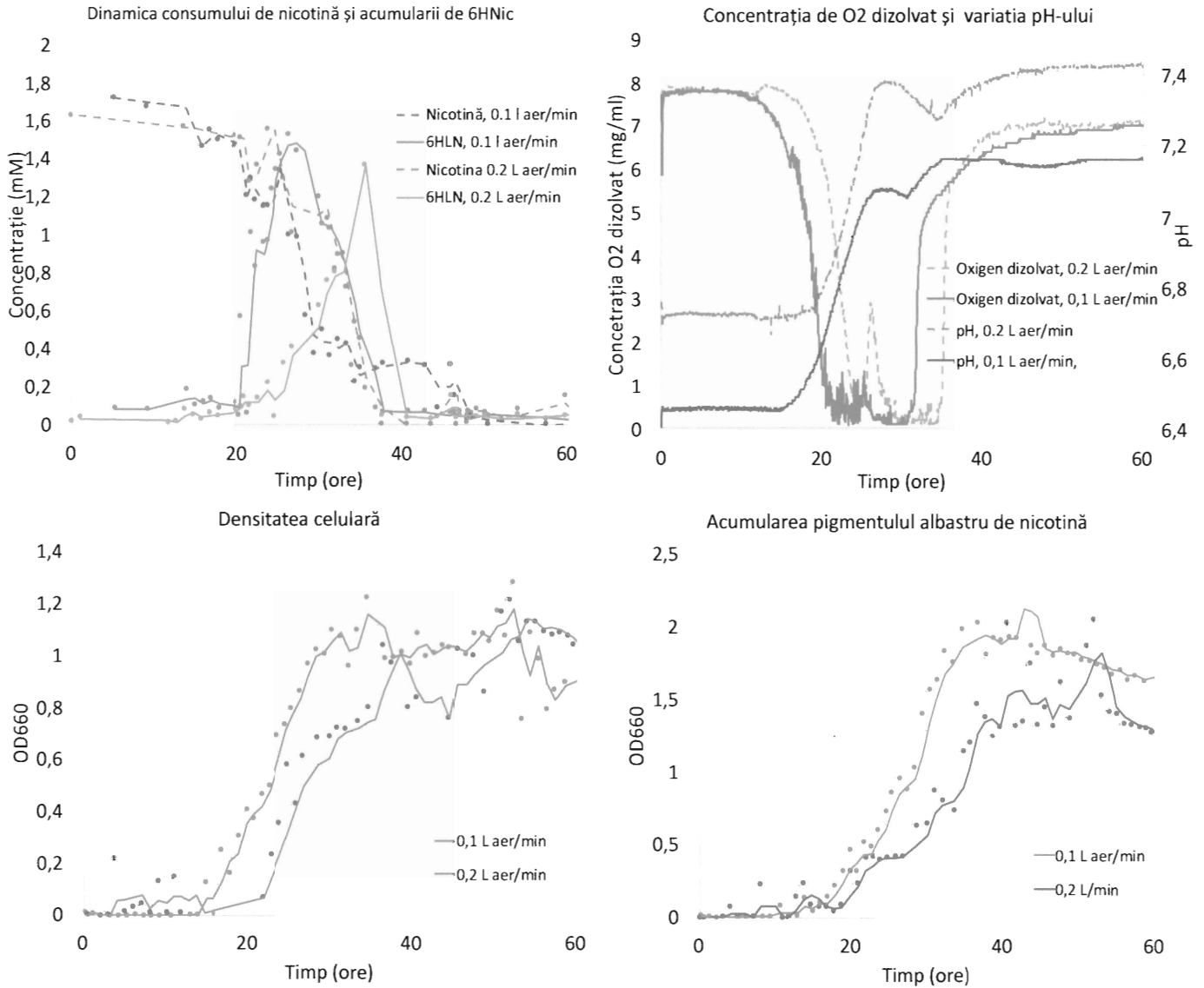


Figura 1. Influența nivelului de aerare (L aer/min) asupra vitezei de acumulare a 6HLN, vitezei de metabolizare a nicotinei (viteza de acumulare a pigmentului albastru și concentrația de nicotină din mediu), pH-ului mediului de creștere, nivelului de O₂ dizolvat disponibil, vitezei de creștere (densitate celulară), în cursul dezvoltării culturilor de *Paenarthrobacter nicotinovorans* pAO1 ATCC 49919 .

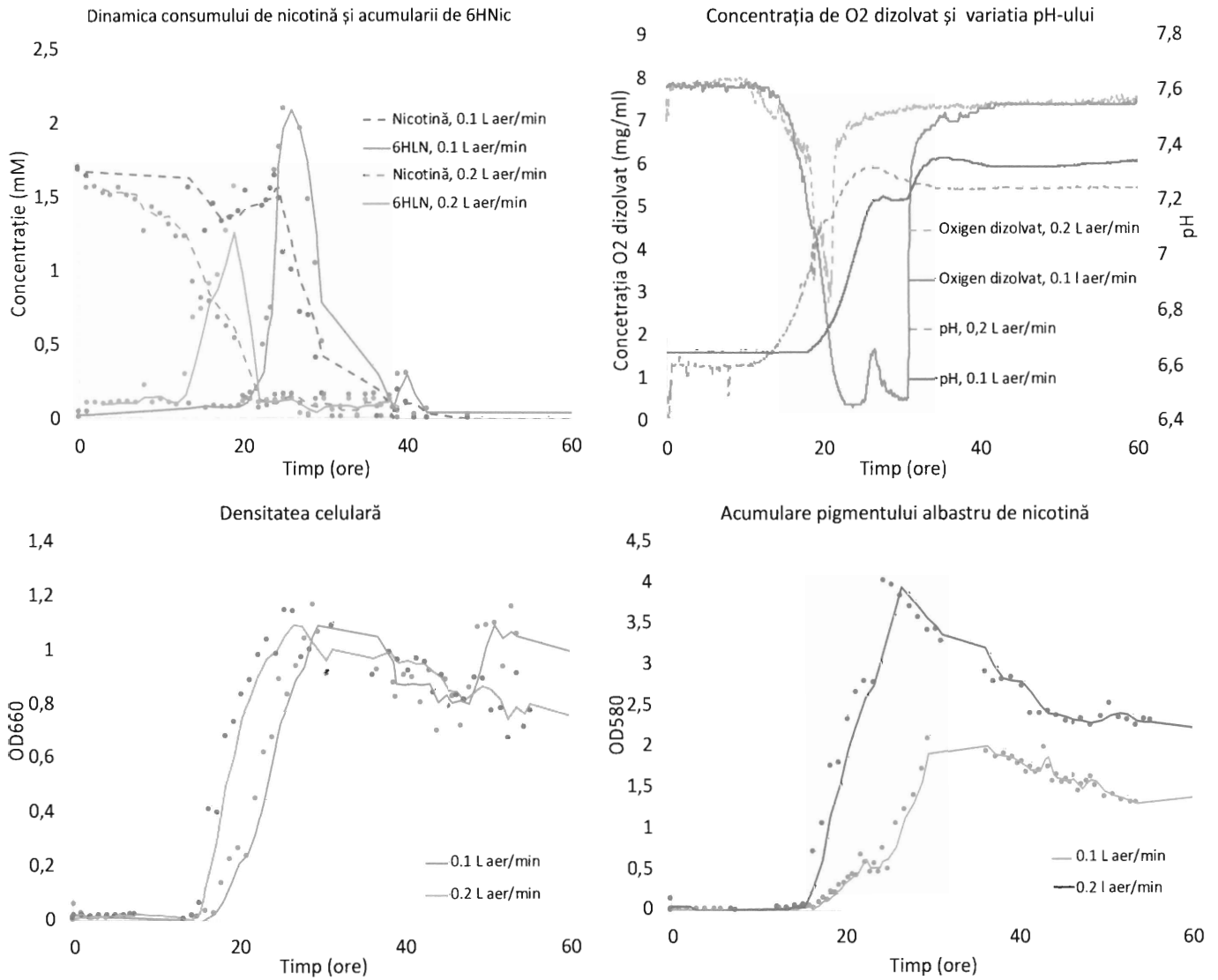


Figura 2. Influența nivelului de aerare (L aer/min) asupra vitezei de acumulare a 6HLN, vitezei de metabolizare a nicotinei (viteza de acumulare a pigmentului albastru și concentrația de nicotină din mediu), pH-ului mediului de creștere, nivelului de O₂ dizolvat disponibil, vitezei de creștere (densitate celulară), în cursul dezvoltării culturilor de *Paenarthrobacter nicotinovorans* NCAIM P(B) 001499.

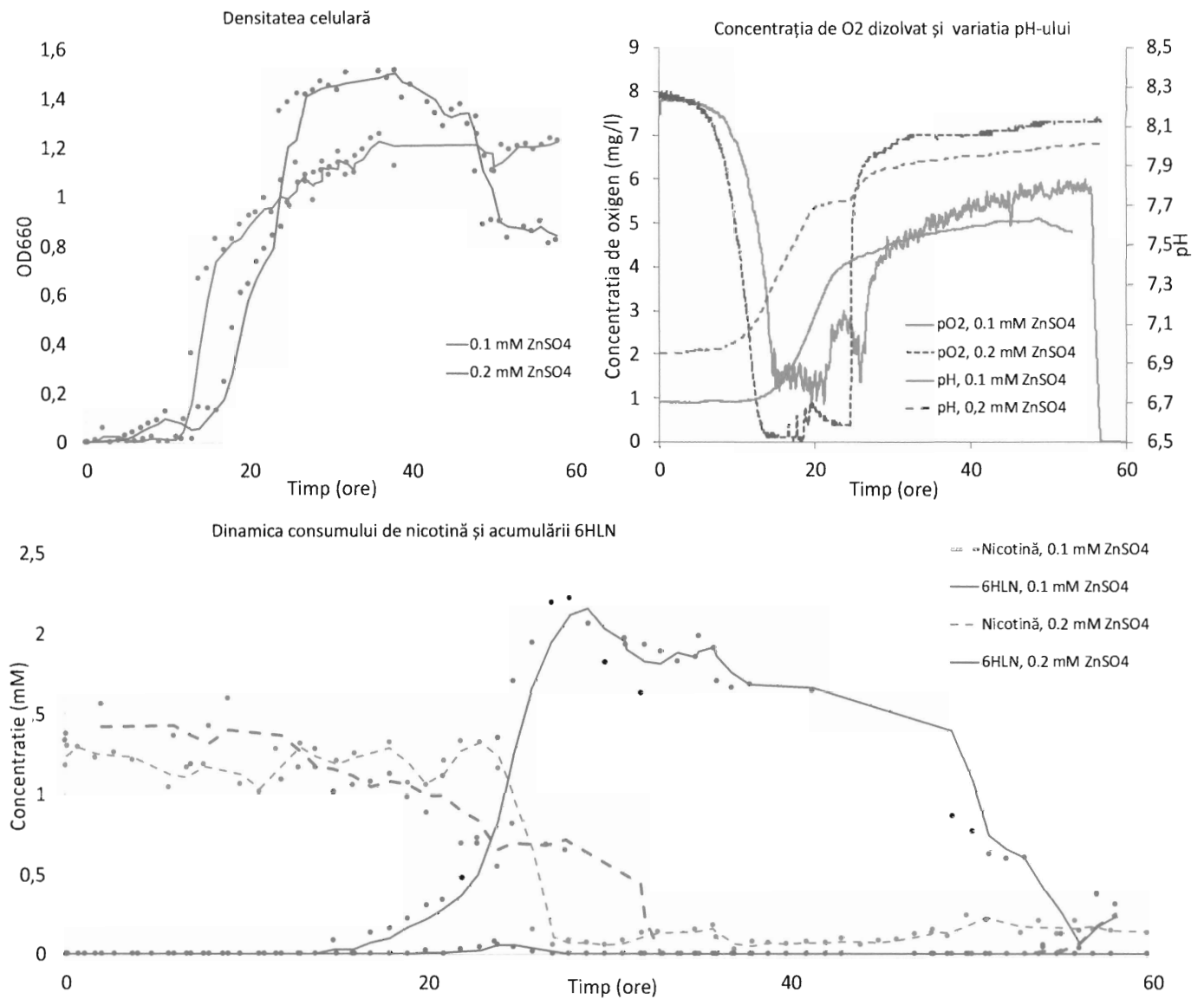


Figura 3. Influența ZnSO₄, un inhibitor al 6HLNO asupra vitezei de creștere (densitate celulară), pH-ului mediului de creștere, nivelului de O₂ dizolvat disponibil, vitezei de acumulare a 6HLN și asupra vitezei de metabolizare a nicotinei în cursul dezvoltării culturilor de *Paenarthrobacter nicotinovorans* NCAIM P(B) 001499 la un nivel de aerare de 0.1 L aer/min.