



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

BIOTRANSFORMACE FENOLICKÝCH LÁTEK S VYUŽITÍM BAKTERIE SCHLEGELELLA THERMODEPOLYMERANS

BIOTRANSFORMATION OF PHENOLIC COMPOUNDS BY BACTERIUM SCHLEGELELLA
THERMODEPOLYMERANS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tomáš Opial

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1895/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Bc. Tomáš Opial**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Biotransformace fenolických látek s využitím bakterie *Schlegelella thermodepolymerans*

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na téma biotransformace fenolických látek
2. Posouzení vlivu kyseliny ferulové a dalších fenolických látek na růst kultury *S. thermodepolymerans*
3. Studium metabolismu biotransformace kyseliny ferulové
4. Posouzení možného využití *S. thermodepolymerans* k produkci senzoričky aktivních látek

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Tomáš Opial
student

prof. Ing. Stanislav Obruča,
Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práca sa zaoberá optimalizáciou biotransformácie kyseliny ferulovej na senzoričky aktívne látky a produkciou P3HB pomocou baktérie *Schlegelella thermodepolymerans*. Boli prevedené kultivačné experimenty, v ktorých bola použitá kyselina ferulová o rôznej koncentrácii a boli využité štyri kmene baktérie *Schlegelella thermodepolymerans*. Pozornosť sa venovala modelovému kmeňu DSM 15344 pri ktorom bola vykonaná aj bioinformatická analýza génov kódujúce enzýmy, ktoré katalyzovali biotransformačné reakcie kyseliny ferulovej. Pomocou HPLC boli sledované metabolity kyseliny ferulovej, konkrétne senzoričky aktívne látky ako vanilylalkohol, kyselina vanilová, vanilín a 4-vinylguaiacol. *S. thermodepolymerans* DSM 15344 preukázala veľmi rýchlu utilizáciu kyseliny ferulovej už v priebehu 8 hodín kultivácie. Najvyššie výt'azky metabolitov kyseliny ferulovej boli detegované v čase 8 až 24 hodín v závislosti na počiatočnej koncentrácii kyseliny ferulovej. Hlavnými metabolitmi kyseliny ferulovej bola kyselina vanilová a vanilylalkohol. Najvyššia koncentrácia kyseliny vanilovej bola detegovaná v 16. hodine za využitia kyseliny ferulovej o počiatočnej koncentrácii 0,5 g/l. K najvyššiemu výt'azku vanilylalkoholu došlo v čase 8 hodín pri kyseline ferulovej o počiatočnej koncentrácii 0,75 g/l. Okrem biotransformácie kyseliny ferulovej bolo zaznamenané aj vyprodukované množstvo P3HB pomocou GC-FID. *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 vyprodukovala najvyššie množstvo P3HB v čase 72 hodín pri najnižšej počiatočnej koncentrácii kyseliny ferulovej (0,25 g/l). V rámci bioinformatickej analýzy bola pomocou dostupných databáz a nástroju BLAST potvrdená prítomnosť jedného génu *fcs*, to však nestačilo na zostrojenie kompletnej metabolickej dráhy kyseliny ferulovej baktériou *S.thermodepolymerans* DSM 15344.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

kyselina ferulová, kyselina vanilová, vanilylalkohol, vanilín, 4-vinylguaiacol, biotransformácia, *Schlegelella thermodepolymerans*, P3HB

ABSTRACT

The diploma thesis deals with the optimization of the biotransformation of ferulic acid into sensory active substances and production of P3HB by bacterium *Schlegelella thermodepolymerans*. Cultivation experiments were performed in a medium with various concentrations of ferulic acid. Four bacterial strains were used for these experiments. Attention was paid to the model strain DSM 15344, in which a bioinformatic analysis of genes encoding enzymes, that catalyzed the biotransformation reactions of ferulic acid was also performed. Ferulic acid metabolites, specifically sensory active substances such as vanillyl alcohol, vanillic acid, vanillin and 4-vinylguaiacol, were measured by HPLC. *S. thermodepolymerans* DSM 15344 exhibited a very fast utilization of ferulic acid already within 8 hours of cultivation. The highest yields of ferulic acid metabolites were detected between 8 and 24 hours depending on the initial concentration of ferulic acid. The main metabolites of ferulic acid were vanillic acid and vanillyl alcohol. Vanillic acid reached the highest concentration in 16 hours in the presence of ferulic acid at initial concentration of 0.5 g/l. The highest yield of vanillyl alcohol occurred in 8 hours with ferulic acid at initial concentration of 0.75 g/l. In addition to biotransformation to ferulic acid, the amount of produced P3HB was also measured by GC-FID. *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 produced the highest amount of P3HB at 72 h at the lowest initial concentration of ferulic acid (0.25 g/l). Within the bioinformatic analysis, the presence of one *fcs* gene was confirmed using the available databases and the BLAST tool, but this was not enough to construct the complete metabolic pathway of ferulic acid by the bacterium *S. thermodepolymerans* DSM 15344.

KEYWORDS

ferulic acid, vanillic acid, vanillyl alcohol, vanillin, 4-vinylguaiacol, biotransformation, *Schlegelella thermodepolymerans*, P3HB

CITÁCIA

Citácia tlačenej práce:

OPIAL, Tomáš. *Biotransformace fenolických láték s využitím bakterie Schlegelella thermodepolymerans*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148627>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

Citácia elektronického zdroja:

OPIAL, Tomáš. *Biotransformace fenolických láték s využitím bakterie Schlegelella thermodepolymerans* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-07]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148627>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som rád poďakoval svojmu vedúcemu diplomovej práce pánovi prof. Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, pomoc a cenný čas, ktorý mi venoval. Ďalej by som sa chcel poďakovať Ing. Vendule Hrabalovej za jej trpezlivosť, pomoc pri práci v laboratóriu a za jej rady pri spracovaní práce. Za pomoc pri realizácii určitých krokov experimentálnej práce si poďakovanie zaslúžia taktiež všetci doktoranti a doktori v laboratóriu biotechnológií a iných. Taktiež by som rád poďakoval svojej rodine a najbližším, ktorí ma podporovali počas štúdia.

Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
2.1	Termofilné baktérie.....	9
2.1.1	<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	9
2.1.2	<i>Schlegelella aquatica</i>	11
2.1.2	Využitie termofilných baktérii v biotechnológiach	12
2.2	Fenolové zlúčeniny	13
2.2.1	Vlastnosti fenolových zlúčenín.....	13
2.2.2	Biosyntéza fenolových zlúčenín	14
2.2.3	Získavanie fenolových zlúčenín z prírodných materiálov.....	15
2.2.4	Zástupcovia fenolových zlúčenín.....	16
2.3	Mikrobiálna transformácia fenolových zlúčenín	19
2.3.1	Mikrobiálna transformácia kyseliny ferulovej	19
2.3.2	Faktory ovplyvňujúce biotransformáciu fenolických zlúčenín.....	23
2.4	Súčasný výskum v oblasti biotransformácie fenolových látok pomocou termofilných mikroorganizmov	24
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	26
3.1	Použité baktérie, chemikálie a prístroje	26
3.1.1	Použité baktérie.....	26
3.1.2	Použité chemikálie	26
3.1.3	Použité vybavenie a prístroje	26
3.2	Postup kultivačných experimentov s kyselinou ferulovou.....	27
3.2.1	Kultivácia v živnom médiu.....	27
3.2.2	Kultivácia v produkčnom médiu.....	27
3.2.3	Odbery vzoriek spojené so stanovením pH a hodnotením rastu kultúry.....	28
3.2.4	Stanovenie sušiny – biomasa a P3HB	28
3.2.5	Stanovenie supernatantu na HPLC	29
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	30
4.1	Kultivačné experimenty bakteriálnych kmeňov M 15344, DSM 15264 a LMG 21645 s kyselinou ferulovou.....	30
4.1.1	Priebeh biotransformácie FA bakteriálnymi kmeňmi M 15344, DSM 15264 a LMG 21645.....	30
4.1.2	Rastové krivky bakteriálnych kmeňov M 15344, DSM 15264 a LMG 21645	32
4.1.3	Vyprodukovaná biomasa a P3HB bakteriálnymi kmeňmi M 15344, DSM 15264 a LMG 21645 v prítomnosti FA	33

4.2 Kultivačné experimenty baktérie <i>Schlegelella thermodepolymerans</i> M15344 s rôznymi koncentraciami kyseliny ferulovej	35
4.2.1 Priebeh biotransformácie FA kmeňom M 15344 pri rôznych počiatkových koncentraciach FA	35
4.2.2 Vyprodukovaná biomasa a P3HB kmeňom M 15344 pri rôznych počiatkových koncentraciach FA	38
4.3 Kultivačné experimenty baktérie <i>Schlegelella thermodepolymerans</i> DSM 15344 s kyselinou ferulovou.....	40
4.3.1 Priebeh biotransformácie kyseliny ferulovej kmeňom DSM 15344.....	41
4.3.2 Vyprodukovaná biomasa a P3HB kmeňom DSM 15344 v prítomnosti FA	42
4.4 Kultivačné experimenty baktérie <i>Schlegelella thermodepolymerans</i> DSM 15344 s kyselinou ferulovou a abiotická kontrola kyseliny ferulovej	42
4.4.1 Priebeh biotransformácie kyseliny ferulovej kmeňom DSM 15344.....	43
4.4.2 Abiotická kontrola kyseliny ferulovej.....	44
4.4.3 Rastová krivka kmeňa DSM 15344	45
4.4.4 Vyprodukovaná biomasa a P3HB kmeňom DSM 15344 v prítomnosti FA	45
4.5 Kultivačné experimenty baktérie <i>Schlegelella thermodepolymerans</i> DSM 15344 s rôznymi koncentraciami kyseliny ferulovej	46
4.5.1 Priebeh biotransformácie kyseliny ferulovej kmeňom DSM 15344 pri rôznych počiatkových koncentraciach FA	46
4.5.2 Vyprodukovaná biomasa a P3HB kmeňom DSM 15344 pri rôznych počiatkových koncentraciach FA	51
4.6 Bioinformatická analýza transformačnej dráhy kyseliny ferulovej pomocou <i>S. thermodepolymerans</i> DSM 15344.....	54
5 ZÁVER.....	57
6 ZDROJE	60
7 ZOZNAM SKRATIEK	66
8 ZOZNAM PRÍLOH.....	67

1 ÚVOD

Potravinársky a poľnohospodársky priemysel sa vzhľadom na rastúcu populáciu neustále technologicky vyvíja. Poľnohospodársky a potravinársky sektor musí kvôli zvyšujúcemu dopytu po potravinách smerovať k industrializácii a naďalej zlepšovať technológie spojené s výrobou. Zavedenie industrializácie ale spôsobuje výslednú tvorbu odpadu, ktorý predstavuje významnú environmentálnu výzvu. Väčšina odpadov produkovaných agropotravinárskym priemyslom má vysoký obsah živín a pokiaľ odpady nie sú dostatočne spracované tak môžu tvoriť živnú pôdu pre škodlivé mikróby, ktoré majú negatívny vplyv na úrodnosť pôdy. Odpady z potravinárskeho priemyslu obsahujú ale aj rôzne látky, ktoré je možné valorizovať, napríklad na produkciu ďalších látok s pridanou hodnotou pomocou mikroorganizmov.

V súčasnosti sa zdôrazňujú koncepty „biohospodárstva“ a „biorafinérie“, pričom odpady z jedného odvetvia môžu slúžiť ako surovina pre iné odvetvie. Komerčná výroba niektorých cenných látok je spojená okrem negatívneho dopadu na životné prostredie aj s vysokými finančnými nárokmi a preto „zelená“ výroba týchto látok využitím odpadových surovín sa stáva čoraz atraktívnejšou možnosťou.

Mnohé odpady vznikajúce v agropriemysle majú lignocelulózový charakter, ktoré vo všeobecnosti obsahujú lignín a majú vysoký obsah polysacharidov, ako je celulóza a hemicelulóza. Okrem toho, obsahujú aj ďalšie živiny, ako sú proteíny, lipidy, pektín a polyfenoly. Jedným spôsobom využitia lignocelulózového odpadu na biosyntézu produktov s pridanou hodnotou je proces biotransformácie. Biotransformácia je proces, ktorý využíva enzýmy na uskutočnenie jedno alebo viac stupňových premenení jednej látky na druhú. Vhodnou zlúčeninou na biotransformáciu môže byť kyselina ferulová, ktorá je fenolovou kyselinou spomedzi fenolových zlúčenín nachádzajúcich sa v lignocelulózovom odpade. Biotransformáciou kyseliny ferulovej je možné získať rôzne látky s pridanou hodnotou vrátane sensoricky aktívnych látok ako vanilylalkohol, kyselina vanilová, vanilín a 4-vinylguaiacol, ktoré sú veľmi cennými zlúčeninami v potravinárskom, farmaceutickom a kozmetickom priemysle.

Sľubnými kandidátmi na premenu kyseliny ferulovej sú napríklad termofilné baktérie, ktoré pomocou svojich enzýmov sú schopné metabolizovať kyselinu ferulovú na iné látky s pridanou hodnotou. Touto mikrobiálnou transformáciou by bolo možné vyprodukovať sensoricky a biologicky aktívne látky efektívnejším spôsobom využitím kyseliny ferulovej ako fenolovej zlúčeniny lignocelulózového odpadu a predísť tak environmentálnym a ekonomickým problémom. Okrem biotransformácie kyseliny ferulovej sú viaceré termofilné baktérie aj schopné produkovať biodegradabilný materiál poly-3-hydroxybutyrát, ktorý by mohol byť náhradou konvenčných plastov. Zámerom tejto diplomovej práce je preto optimalizovať podmienky produkcie sensoricky aktívnych látok premenou kyseliny ferulovej a produkcie P3HB pomocou termofilnej baktérie *Schlegella thermodepolymerans*.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Termofilné baktérie

Termofilné baktérie sú schopné rasti pri teplotách vyšších ako 40 °C s optimálnymi podmienkami na rast pri teplotách najmenej 50–55 °C. Vyskytujú sa v termálnych prameňoch (Obrázok 1), sopečných náleziskách a taktiež v komposte. Výskyt termofilných organizmov v zmienенých lokalitách je závislý na rôznych faktoroch, ako je teplota, pH a hladina rozpusteného sírovodíka. Termofily sa ďalej delia na extrémne termofily s optimálnou teplotou rastu 60–80 °C a hypertermofily s optimálnou teplotou rastu 80–110 °C. Ďalej sa delia na gram-positívne a gram-negatívne termofily, kde hlavným rozdielom medzi G⁺ a G⁻ mikroorganizmami je to, že gram-positívnym baktériám chýba vonkajšia membrána, ale sú obklopené vrstvami peptidoglykán, ktoré sú mnohonásobne hrubšie ako u gram-negatívnych baktérií. Typickým zástupcom gram-negatívnych termofilov je rod *Thermus* a u gram-positívnych to je napríklad rod *Caldicellulosiruptor*. A nakoniec sa delia na baktérie schopné rasti za anaeróbných alebo aeróbných podmienok a niektoré môžu tvoriť spóry. K sporotvorným termofilným baktériám patrí rod *Bacillus*, *Clostridium*, a *Moorella* [1, 2, 3, 4].

Súčasťou termofilných baktérií sú ich významné enzýmy vďaka ktorým je možné katalyzovať reakcie v priemysle pri zvýšených teplotách (napríklad pri výrobe palív a iných chemikálií). Reakcie pri zvýšenej teplote prinášajú mnoho výhod ako nízka pravdepodobnosť kontaminácie, väčšia rozpustnosť substrátov, čo je spojené s nižšími nákladmi na výrobu [1, 2].

Na druhú stranu existujú aj termofilné baktérie, ktoré sú nežiadúce vo výrobe v potravinárskom priemysle; sú to napríklad baktérie rodu *Streptococcus*, *Lactobacillus* a *Enterococcus*, ktoré sú odolné nie len voči vysokej teplote ale aj voči silným kyselinám. Vďaka ich odolnosti prežijú pasterizáciu a môžu rásť v okyslenom prostredí spojenom s výrobou mliečnych výrobkov, kde pri teplote nad 40 °C môžu spôsobovať kontamináciu [5, 6].



Obrázok 1: Termálny prameň ako nálezisko termofilných baktérií [7]

2.1.1 *Schlegelella thermodepolymerans*

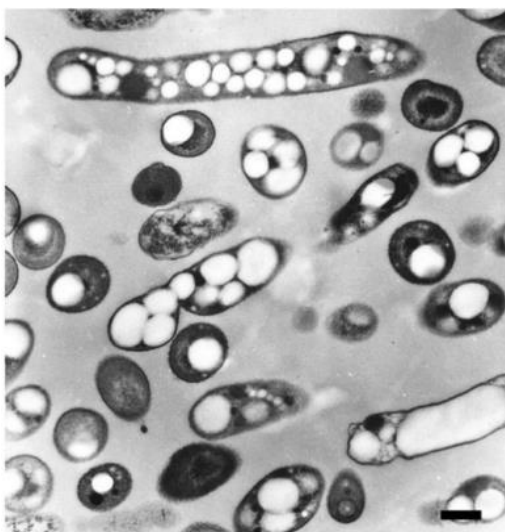
Rod *Schlegelella* patrí fylogeneticky do β -podtriedy Proteobaktérií, pričom typovým druhom je *Schlegelella thermodepolymerans*. Baktérie rodu *Schlegelella* boli pomenované na počesť priekopníka výzkumu polyhydroxyalkanoátov (PHA) H. G. Schlegela. Jedná sa o gram-negatívne aeróbné termofilné baktérie v tvare tyčinky bez schopnosti tvoriť spóry. Teplotný rozsah pre rast je 40–60 °C, s optimom okolo 50 °C [8].

2.1.1.1 Charakteristika baktérie *Schlegelella thermodepolymerans*

Rod *Schlegelella* nebol doposiaľ celý rozsiahlo preštudovaný a preto časť charakteristiky druhu *thermodepolymerans* je založená napríklad aj na údajoch získaných pre kmene K14T a DhA-71 zo štúdie Elbanna a spol.: Bunky sú 1,0–2,8 mm dlhé, 0,5–0,6 mm široké a sú pohyblivé pomocou polárnych monotrichálnych bičiek. Kmene dobre rastú na komplexných médiách pri 45–50 °C. Kolónie sú biele a hladké, s konvexným vyvýšením, celými okrajmi a maslovou textúrou, buď nepriehľadnou alebo priesvitnou. Rozsah pH pre rast je 6–9 s optimom pri pH 7. Kmene sú schopné utilizovať kyselinu dehydroabietovú, glukonát, laktát, 3-hydroxybutyrát, valerát a poly(3-HB) [8].

2.1.1.2 *Schlegelella thermodepolymerans* ako producent polyhydroxyalkanoátov

Výzkum *S. thermodepolymerans* je zameraný aj na jej produkciu polyhydroxyalkanoátov. PHA je biodegradabilný polymér, ktorý patrí k najslubnejším kandidátom na riešenie ekologického problému spôsobeného veľkým množstvom konvenčných syntetických plastov. PHA sú produkované mikroorganizmami pri nadbytku uhlíku a obmedzeného množstva esenciálnych živín (dusík, fosfor, horčík alebo síra), ktoré potrebujú na ukládanie energie. PHA sú produkované v cytoplazme vo forme vo vode nerozpustných granúl (Obrázok 2). PHA pomáha mikroorganizmom prežiť v podmienkach environmentálneho stresu a je kľúčovým mechanizmom ich prežitia. Počas hladovania prítomnosť PHA chráni bunkové zložky ako RNA a taktiež má potenciálne ochranné mechanizmy pre bakteriálne bunky, keď sú vystavené mrazu a rozmrazovaniu, osmotickým šokom, oxidačnému tlaku, vysychaniu, prísunu H₂O₂, ťažkým kovom a UV žiareniu [9].



Obrázok 2: Snímok PHA granúl v baktérii *Cupriavidus necator* z TEM [10]

2.1.1.3 Genóm baktérie *Schlegelella thermodepolymerans*

Schlegelella thermodepolymerans bola pôvodne skúmaná pre svoju schopnosť degradovať extracelulárne PHA materiály ako napríklad kopolyméry 3-hydroxybutyrátu a 3-merkaptopropionátu. Výskum je v súčasnosti už zameraný skôr na schopnosť tejto termofilnej baktérie produkovať PHA s optimálnou teplotou rastu 55 °C, ktorá znižuje riziko kontaminácii počas PHA syntézy. Z výsledkov práce Ing. Kouřilovej a kol. bol prekvapivo najvyšší výťažok získaný na xylóze ako zdroji uhlíku, čo bol prekvapivý objav, pretože obvykle bývajú vyššie

výtazky na šesťuhlíkatých sacharidoch. Výsledky naznačujú, že *S. thermodepolymerans* má jedinečný metabolizmus xylózy, pretože xylóza sa využíva prednostne s najvyššou mierou spotreby v porovnaní s inými cukrami. V genóme *S. thermodepolymerans* DSM 15344, sa nachádzal unikátny domnelý xyl operón pozostávajúci z génov zodpovedných za využitie xylózy a tiež bol identifikovaný jej transportér, čo je unikátna vlastnosť medzi producentami PHA. Baktéria je schopná biosyntézy kopolymérov obsahujúcich 3-hydroxybutyrátové a tiež 3-hydroxyvalerátové podjednotky. Teda *S. thermodepolymerans* sa zdá byť sľubným kandidátom z termofilných baktérií na produkciu PHA zo substrátov bohatých na xylózu [11, 12, 13].

V ďalšom významnom článku Ing. Musilovej a kol. bola predstavená prvá kvalitná kompletná sekvencia genómu baktérie *Schlegelella thermodepolymerans*, ktorá je v súčasnosti referenčnou sekvenciou pre druhy *S. thermodepolymerans* v GenBank databáze. Bol anotovaný genóm, bola predpovedaná štruktúra operónu a bola hľadaná profágová DNA a CRISPR polia. Dĺžka genómu je 3 858 501 bp a obsahuje celkovo 3 650 génov rozdelených na 1 729 operónov. Väčšina génov sú proteín kódujúce sekvencie (CDS). Obsah GC (podiel guanino-cytosinového komplementárneho páru) dosiahol hodnotu 70,28 %, čo je viac ako priemer pre gramnegatívne baktérie. Splnila však očakávania, nakoľko zodpovedala hodnota 70,3 % predtým publikovaných návrhov genómov. Vysoký obsah GC môže súvisieť s adaptáciou baktérie do prostredia s vysokou teplotou. Aj keď len single kópie génov rRNA boli detegované v návrhoch genómov *S. thermodepolymerans* DSM 15344, úplný genóm sekvencie obsahuje 5S, 16S a 23S rRNA gény v duplikátoch. Okrem toho sa kópie génov 16S a 23S rRNA líšia v troch a jednej pozícii, čo znamená, že informácie sú užitočné pre budúcu identifikáciu *S. thermodepolymerans* v štúdií metagenomike a kvantifikácii jeho množstva v mikrobiologickej štúdií založenej na sekvenovaní amplicónov [12].

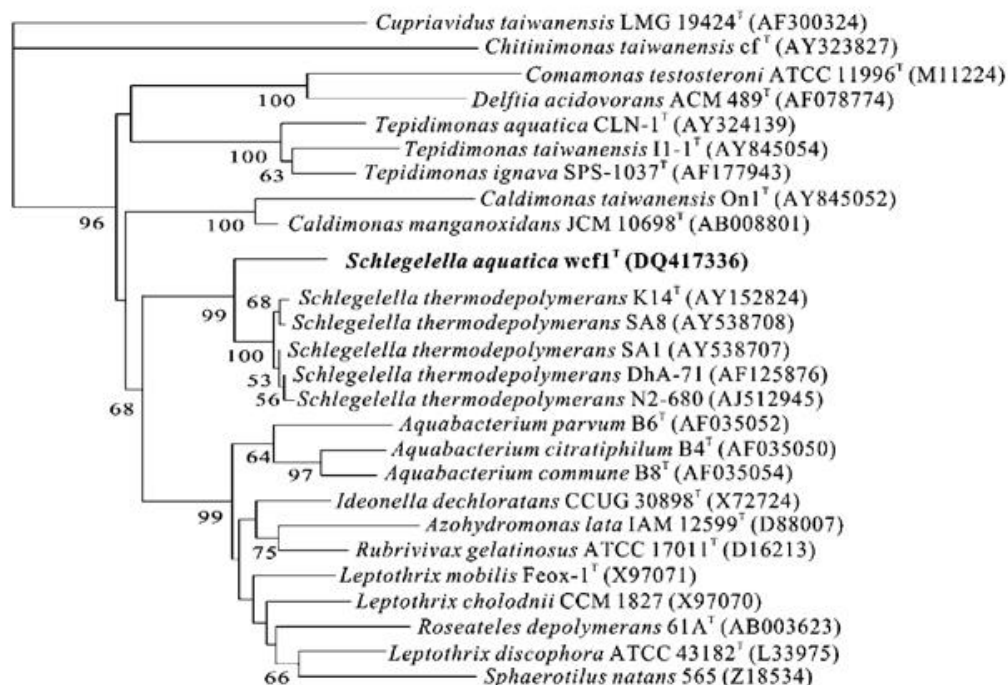
2.1.2 *Schlegelella aquatica*

Ďalším skúmaným druhom rodu *Schlegelella* bola baktéria *Schlegelella aquatica*, ktorá bola izolovaná z termálneho prameňa v oblasti Tainan, v južnom Taiwane pod vedením Choua a kol. Kmeň wcf1T rástol dobre v aeróbných podmienkach v komplexných médiách so zníženou koncentráciou živín. Pri poskytnutí vyšších koncentrácií živín bol rast pomerne slabý. Kmeň wcf1T vytvoril viditeľné, krémové alebo biele kruhovo a konvexne tvarované kolónie s celými okrajmi. Veľkosť kolónie bola približne 1,0–1,5 mm v priemere na 10% LB agarových platniach po inkubácii počas 48 hodín pri 55 °C. Kmeň wcf1T rástol dobre pri teplote v rozmedzí od 30 °C do 60 °C a od pH 6 do 8. Optimálny rast nastal pri 50 °C a pH 7. Kmeň wcf1T po 120 hodinách inkubácie pri 50 °C pri anaeróbných podmienkach už naďalej nerástol [14].

Bunky kmeňa wcf1T boli identifikované ako gramnegatívne tyčinky, pohyblivé polárnymi bičikmi, netvoriace spóry, s veľkosťou 0,4–0,5 mm v priemere a 0,8–2,0 mm na dĺžku. Poly- β -hydroxybutyrátové granule boli pozorované po farbení čiernym Sudanom [14].

V práci Choua a kol. bola získaná takmer úplná sekvencia génu 16S rRNA (1419 nt) pre kmeň wcf1T. Porovnanie poradia so zástupcami rodov zaradených do Betaproteobaktérii ukázali, že organizmus spadol do evolučného rozdelenia obsadené rodom *Schlegelella* (obr. 3). Podľa výpočtov podobnosti sekvencií organizmus bol najviac podobný spomínanému kmeňu *S. thermodepolymerans* K14T (97–98% podobnosť), kmeňu DhA-71 (97–98% podobnosť) a inými. Úroveň podobnosti kmeňu wcf1T s inými bakteriálnymi druhmi s platne publikovanými

menami v rámci Betaproteobaktérií bolo menej ako 95 %. V experimentoch bola pre celý genóm použitá metóda hybridizácie DNA-DNA, ktorá je založená na denaturácii a renaturácii DNA. Kmeň wcf1T vykazoval relatívne nízku DNA-DNA hodnotu príbuznosti (45%) s *S. thermodepolymerans* K14T, čo jasne naznačuje, že kmeň wcf1T predstavuje nový druh baktérie rodu *Schlegelella* [14].



Obrázok 3: Fylogenetická analýza založená na génových sekvenciách 16S rRNA dostupných od GenBank/EMBL/DDBJ (prístupové čísla sú uvedené v zátvorkách) skonštruované po viacnásobnom zarovnaní údajov ukazujúcich polohu kmeňa wcf1T v rode *Schlegelella* [14]

2.1.2 Využitie termofilných baktérii v biotechnológiach

Okrem využitia termofilných baktérii na syntézu biodegradovateľných polymérov PHA majú termofily potenciál aj na iné aplikácie v biotechnológiach a iných odvetvi. Príkladom môže byť DNA polymeráza baktérie *Thermus aquaticus* alebo zlepšenie antioxidačnej aktivity fenolových látok pomocou *Streptococcus thermophilus*, čím sa budú zaoberať nasledujúce podkapitoly [15, 16, 17, 18].

2.1.2.1 Taq DNA polymeráza

Jedným z príkladov využitia termofilných baktérii v biotechnológiach je geneticky upravená DNA polymeráza baktérie *Thermus aquaticus*, takzvaná Taq DNA polymeráza. Výzkum Taq DNA polymerázy značne zjednodušuje postup PCR (polymerázová reťazová reakcia), pretože už nie je potrebné dopĺňať enzýmy po každom cykle PCR. Použitie Taq DNA polymerázy pri vysokých teplotách žihania a predlžovania zvyšuje špecifickosť, výťažok a dĺžku produktov, ktoré môžu amplifikovať, a tak zvyšuje citlivosť PCR pre detekciu vzácných cieľových sekvencií. V štúdiu M. A. Innisa a kol. bolo dokázané, že Taq DNA polymeráza je rýchla a veľmi efektívna. V tejto štúdiu šlo o predlžovanie priméra hybridizovaného v jednovláknovej DNA s ekvimolárnym množstvom Taq DNA polymerázy. Do 2 minút pri 70 °C bol replikovaný celý 7,25-kilobázový templát; to zodpovedá rýchlosti predlžovania presahujúcej 60 nukleotidov

za sekundu. Taq DNA polymeráza si zachovala významnú aktivitu pri nižšej teplote s vypočítanými rýchlosťami predlžovania 24–1,5–0,25 nukleotidov za sekundu pri 55 °C, 37 °C a 22 °C. Pri 70 °C a podstatnom prebytku substrátu (0,1: 1 molárny pomer polymerázy k priméru) väčšina iniciovaných primerov bola úplne predĺžená pred opätovnou iniciáciou na novom substráte primeru. Tieto výsledky dokázali, že Taq DNA polymeráza je vysoko výkonná a efektívna na sekvenovanie DNA [15, 16, 17].

2.1.2.2 Zlepšenie antioxidačnej aktivity fenolových látok termofilnými baktériami

V štúdiu Linga a kol. sa pokúsili o zlepšenie antioxidačnej aktivity jujubového pyré (cicimek čínsky) pomocou termofilnej baktérie. Na výskum vplyvu fermentácie baktérií mliečneho kvasenia na bioaktivitu plodu jujuby (konkrétne jujubového pyré) bola použitá baktéria *Streptococcus thermophilus*. Analyzoval sa počet životaschopných bakteriálnych buniek, fyzikálne-chemické vlastnosti, fenolový profil a antioxidačná kapacita a skúmala sa ich korelácia. *Streptococcus thermophilus* vykazoval vysokú rastovú kapacitu v jujubovom pyré a významne zvýšil celkový obsah fenolov a aktivitu zachytávania 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) po 48 hodinách fermentácie. Vo fermentovanom jujubovom pyré bolo identifikovaných 12 rozdielne metabolizovaných polyfenolov. Fenolové látky vykazovali pozitívnu koreláciu so schopnosťou zachytávať radikály DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl). Táto práca dokázala, že fermentácia baktériou *Streptococcus thermophilus* môže byť účinnou metódou s veľkým praktickým aplikačným potenciálom na zlepšenie antioxidačnej aktivity v jujubovom pyré modifikáciou množstva a kvality fenolového zloženia [18].

2.2 Fenolové zlúčeniny

Fenolové zlúčeniny vrátane jednoduchých fenolov, fenolových kyselín, derivátov kyseliny hydroxyškoricovej a flavonoidov sú bioaktívne látky vyskytujúce sa vo veľkej miere v rôznych typoch rastlín. Fenolové zlúčeniny sú najhojnejším sekundárnym metabolitom rastlín a zohrávajú dôležitú úlohu pri raste a adaptácii rastliny v ekosystéme. Fenolové zlúčeniny taktiež úzko súvisia so senzorickou a nutričnou kvalitou čerstvej a spracovanej rastlinnej stravy [19, 20, 21].

2.2.1 Vlastnosti fenolových zlúčenín

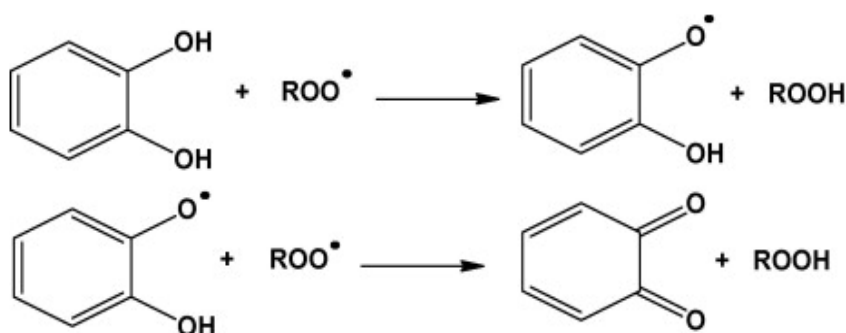
Fenolové zlúčeniny sú spojené s priaznivými účinkami a to sa najmä jedná o ich antioxidačnú aktivitu. Balasundram a kol., zhodnotili antioxidačnú aktivitu, výskyt a latentné použitie fenolových zlúčenín v rastlinách a vedľajších agropriemyselných produktoch. Podľa týchto správ sú hlavnými zdrojmi fenolových zlúčenín v ľudskej strave ovocie a zelenina. Rastlinné polyfenoly ako antioxidanty v potrave môžu chrániť ľudské zdravie pred oxidačným poškodením a tým zohrávajú dôležitú úlohu pri brzdení rôznych ľudských chorôb [20].

Mnohé štúdie uvádzajú výhody fenolových zlúčenín, ako je ochrana pred starnutím pokožky, protizápalové, antioxidačné a antiproliferatívne vlastnosti. Okrem toho podporujú metabolizmus sacharidov a lipidov, zmiernujú hyperglykémiu, dyslipidémiu a inzulínovú rezistenciu, zlepšujú funkciu β -buniek, stimulujú sekréciu inzulínu, zmiernujú oxidačný stres, signálne dráhy citlivé na stres a zápalové procesy [21].

2.2.1.1 Antioxidačné vlastnosti fenolických zlúčenín

V mnohých štúdiách sa potvrdilo že výskyt rakoviny a kardiovaskulárnych ochorení je úzko spojený s nedostatkom príjmu ovocia a zeleniny, ktoré obsahujú fenolové látky nesúce antioxidačné vlastnosti. Existujú presvedčivé dôkazy, že rozvoj týchto chorôb je spojený s poškodzujúcimi účinkami reaktívnych foriem kyslíka, ako je superoxidový voľný radikálový anión, peroxid vodíka, hydroxylový radikál a singletový kyslík. Tieto nežiaduce účinky môžu byť potlačené doplnkom fenolových zlúčenín v strave [22].

Najaktívnejšia zlúčenina plniaca rolu antioxidantu je tá, ktorá má viac ako jednu aktívnu skupinu (napr. NH_2 alebo OH) v orto polohe. Aktívnu antioxidačnú fenolickú zlúčeninou je napríklad katechol, ktorý má dve hydroxylové skupiny v orto polohe. Prvý reťazec nesúci peroxylový radikál bol zachytený prenosom H-atómu z labilného fenolického O-H a druhý reakciou s výsledným fenoxylovým radikálom. Katecholy sú schopné zachytiť dva peroxylové radikály následovne podľa obrázka 4 [22, 23].



Obrázok 4: Reakčný mechanizmus katecholu ako antioxidanta [23]

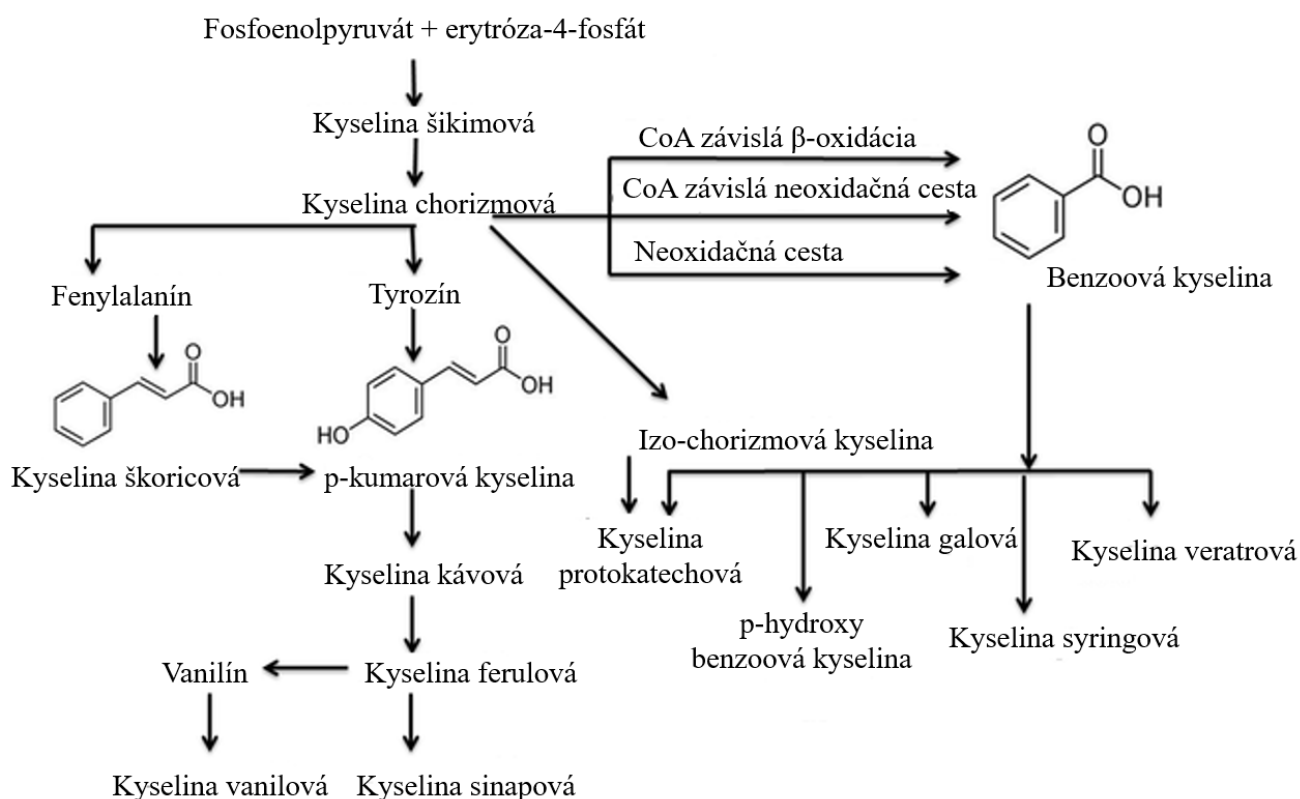
Vysoká antioxidačná aktivita tejto zlúčeniny je spôsobená prítomnosťou skupiny OH v polohe 1,2 v ich molekulovej štruktúre. Táto štruktúrna vlastnosť má schopnosť vytvárať intramolekulárne vodíkové väzby (iHB). Atóm H, ktorý nie je zapojený do tejto väzby, bude potom vyvedený voľnými radikálmi, čo vedie k stabilnému fenoxyl radikálu [23].

2.2.2 Biosyntéza fenolových zlúčenín

Pri syntéze fenolových zlúčenín je prvým krokom zapojenie glukózy do pentózofosfátovej dráhy a ireverzibilná transformácia glukóza-6-fosfátu na ribulóza-5-fosfát. Prvý vykonaný postup pri premene na ribulóza-5-fosfát sa uskutočňuje pomocou glukózo-6-fosfátdehydrogenázy. Na jednej strane konverzia na ribulóza-5-fosfát produkuje redukujúce ekvivalenty nikotínamidadenín-dinukleotidfosfátu (NADPH) pre bunkové anabolické reakcie. Na druhej strane, pentózofosfátová dráha tiež produkuje erytrózu-4-fosfát spolu s fosfoenolpyruvátom z glykolýzy. Fosfoenolpyruvát sa potom ďalej používa prostredníctvom fenypropanoidovej dráhy na generovanie fenolových zlúčenín po nasmerovaní na dráhu kyseliny šikimovej na výrobu fenylyalanínu a tyrozínu (Obrázok 5) [24, 25, 26].

V šikimátovej dráhe reaguje fosfoenolpyruvát s erytróza-4-fosfátom za vzniku kyseliny chorizmovej, ktorá je prekursorom tyrozínu a fenylyalanínu. Fenylyalanín a tyrozín sú prekursorami syntézy fenolových kyselín šikimátovou dráhou kde adícia hydroxylových skupín do fenylového kruhu je kľúčovým krokom v biosyntéze fenolových kyselín. Spočiatku sa fenylyalanín premieňa na kyselinu škoricovú. Následne sa tyrozín premieňa na kyselinu *p*-kumarovú, ktorá je prekursorom kyseliny kávovej a ferulovej z ktorej môže ďalej vznikáť

vanilín a ten sa môže oxidovať na kyselinu vanilovú. Kyselina benzoová sa prevažne syntetizuje z kyseliny chorizmovej prostredníctvom oxidačných a neoxidačných ciest, zatiaľ čo kyselina izochorizmová slúži ako prekursor kyseliny protokatechovej [25, 26].



Obrázok 5: Biosyntéza fenolových zlúčenín šikimátovou dráhou [25]

2.2.3 Získavanie fenolových zlúčenín z prírodných materiálov

V súčasnosti sa fenolové zlúčeniny prevažne získavajú chemickou syntézou alebo extrakciou. Fenolové zlúčeniny sa z prírodných zdrojov izolujú najmä chemickou extrakciou použitím zásad alebo kyselín pri zvýšenej teplote, alebo enzymatickou extrakciou pomocou dostupných komerčných enzýmov. Na získanie týchto zlúčenín sa používajú aj iné techniky, vrátane použitia superkritických tekutín, vysokotlakých procesov a extrakcie mikrovlnami alebo ultrazvukom. Ako príklad, komerčná kyselina ellagová sa získava chemickou extrakciou rastlín bohatých na ellagitanín použitím okysleného metanolu. Nevýhody takéhoto procesu sú ale vysoké náklady, vysoká kontaminácia produktu a celkovo nízky výťažok [27, 28].

Biotransformácia bioaktívnych zlúčenín je zaujímavou alternatívou, ktorá si zaslúži pozornosť hlavne kvôli potenciálnej premene lacných agro-priemyselných vedľajších produktov (rastlinných zbytkov) na veľké množstvo cenných zlúčenín. Biotransformáciu možno definovať ako chemické premeny, ktoré sú katalyzované biologickými systémami prostredníctvom ich účinnej enzymovej aktivity alebo mikroorganizmami prostredníctvom fermentácie v tuhom stave [27, 28].

2.2.4 Zástupcovia fenolových zlúčenín

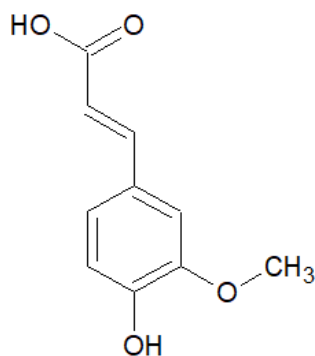
Zástupcami fenolových zlúčenín sú napríklad fenolové kyseliny ako kyselina ferulová a kyselina vanilová. Fenolové kyseliny sú aromatické prírodné fytochemikálie, ktoré pozostávajú z fenolového kruhu a karboxylovej funkčnej skupiny. Fenolové kyseliny sú široko klasifikované na dva typy, t.j. deriváty kyseliny hydroxybenzoovej a deriváty kyseliny hydroxyškoricovej. Každá fenolová kyselina sa chemicky líši v závislosti na počte a polohe hydroxylovej skupiny na aromatickom kruhu [29].

Ďalšími zástupcami vzácnych fenolových zlúčenín využívaných v priemysle vrátane kyseliny vanilovej sú vanilylalkohol, vanilín a 4-vinylguaiacol, ktoré boli sledované v experimentálnej časti tejto diplomovej práce [29].

2.2.4.1 Kyselina ferulová

Kyselina ferulová (kyselina 4-hydroxy-3-metoxyškoricová) je fenolová látka so silnou antioxidačnou aktivitou a je najbežnejším derivátom kyseliny hydroxyškoricovej. Vysoký obsah kyseliny ferulovej sa nachádza v lignocelulóзовých materiáloch ako napríklad pšeničné otruby a preto by mohla byť vhodným kandidátom na biotechnologickú výrobu iných látok s pridanou hodnotou, čím by sa efektívne využil lignocelulóзовý odpad [29, 30].

Jej štruktúra sa odvíja od aminokyselín fenylalanínu a tyrozínu, ktoré sú jej prekurzorom v biosyntéze šikimátovou dráhou. Podobne ako chemická štruktúra fenylalanínu a tyrozínu, kyselina ferulová pozostáva z deväť uhlíkových skeletov (C_6C_3) s dvojnou väzbou s postranným reťazcom (v rastlinách prevažne s *trans* konfiguráciou), ktoré predstavujú fenylpropanoidnú štruktúru (Obrázok 6). V štruktúre kyseliny ferulovej sú dôležitými miestami pre reakcie s reaktívnymi druhmi kyslíka (ROS) hydroxylové funkčné skupiny na benzénovom kruhu a nenasýtená väzba jeho etylénového postranného reťazca. Spôsob substitúcie aromatickej skupiny je teda hlavným vplyvom na bioaktivitu kyseliny ferulovej [29, 31].

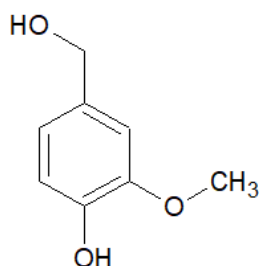


Obrázok 6: Štruktúrny vzorec kyseliny ferulovej [32]

2.2.4.2 Vanilylalkohol

Vanilylalkohol (4-hydroxy-3-metoxybenzylalkohol) je derivát vanilínu substituovaný hydroxymetylovou skupinou v polohe 4 (Obrázok 7). Vanilylalkohol je široko používaný aromatický prípravok a v prírode sa vyskytuje hlavne v rastlinách *Gastrodia elata* a *Vanilla planifolia*. Vanilylalkohol ako jedna z účinných látok rastliny *Gastrodia elata* sa po stáročia tradične používa ako ľudový liek v orientálnych krajinách. Etanolový extrakt pripravený z tejto

rastliny má protizápalové a antiangiogénne účinky. Vanillylalkohol nesie aj ďalšie rôzne biologické aktivity ako napríklad antioxidantné a antiastmatické aktivity. Okrem toho má vanilylalkohol antikonvulzivnú aktivitu a vychytáva voľné radikály. Hlavný prístup k výrobe vanilylalkoholu je priamou extrakciou z rastlín *Gastrodia elata* a *Vanilla planifolia* alebo enzymatickou výrobou redukciami vanilínu. Tieto prístupy sú však obmedzené prítomnosťou surovín, nepriaznivými reakčnými podmienkami a nízkymi výnosmi. Alternatívnou cestou je mikrobiálna biosyntéza, ktorá môže poskytnúť výhodnejší prístup k výrobe vanilylalkoholu [29, 33, 34].

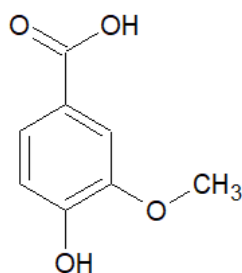


Obrázok 7: Štruktúrny vzorec vanilylalkoholu [35]

2.2.4.3 Kyselina vanilová

Kyselina vanilová je derivát kyseliny benzoovej a je oxidovanou molekulou vanilínu (Obrázok 8). Používa sa ako ochucovadlo, konzervačná látka a aditívum v potravinárskom priemysle vďaka svojej príjemnej vôni. Kyselina vanilová sa prirodzene nachádza v niekoľkých diuretických bylinách, ako sú druhy *Clematis*, *Aspalathus linearis*, *Plantago major* a v rôznych liečivých rastlinách, medzi ktoré patrí jeho vyššie množstvo získané z koreňov *Angelica sinensis*. Extrakcia kyseliny vanilovej z prírodných zdrojov je najviac rozšírená ale ponúka nízky výťažok. Tento nízky výnos nemôže splniť zvýšený dopyt po kyseline vanilovej ako dochucovadla/aditíve v potravinách. Dá sa však splniť biosyntetickými prístupmi, pretože tieto prístupy môžu poskytnúť rozsiahlu výrobu kyseliny vanilovej. Príkladom môže byť oxidácia vanilínu pomocou bakterie *Serratia marcescens* alebo biotransformácia kyseliny ferulovej pomocou huby *Streptomyces sannanensis* [29, 36, 37, 38].

Kyselina vanilová nesie rôzne farmakologické vlastnosti ako napríklad antioxidantné, protizápalové, imunostimulačné, neuroprotektívne, hepatoprotektívne, kardioprotektívne a antiapoptotické. Kyselina vanilová bolo tiež identifikovaná v rôznych častiach ľudského mozgu (kôra, striatum, thalamus, cerebellum, mozgový kmeň a hypotalamus) a neskôr sa dokázalo že je sľubné neuroprotektívne činidlo pri liečbe vaskulárnej demencie. Kyselina vanilová sa teda vďaka svojim priaznivým vlastnostiam môže použiť ako zložka funkčných potravín a taktiež ako doplnok výživy na liečbu alebo prevenciu zápalov a neurologických chorôb [29, 36, 38].

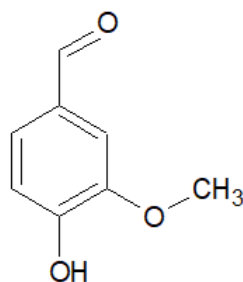


Obrázok 8: Štruktúrny vzorec kyseliny vanilovej [39]

2.2.4.4 Vanilín

Vanilín je hlavnou organoleptickou zlúčeninou prírodnej vanilky a je najžiadanejšou potravinárskou prísadou používanou v potravinách, nápojoch, parfumoch a liečivách. Vanilín sa prirodzene získava z plodu orchidey *Vanilla planifolia*. Tento výrobný proces je ale príliš náročný kvôli vysokým nákladom a tým pádom nie je možné splniť dopyt po vanilíne pre celý svet len izoláciou vanilínu z plodu vanilky. Ročne sa získava len 1 % z celkového množstva vyrobeného vanilínu z plodu *V. planifolia*, zatiaľ čo väčšina vanilínu je získaná chemickou syntézou, hlavne z guaiakolu. Vanilín získaný chemickou syntézou je na základe európskych predpisov považovaný za „umelý“. Preto sa vyvíjajú nové stratégie a metódy na získanie „prírodného“ vanilínu prostredníctvom biosyntézy pomocou mikroorganizmov. Vzhľadom na zvýšený záujem o prírodné produkty, výroba aróm prostredníctvom biotransformačných procesov ponúka vhodnú alternatívu k prírodným a chemickým zdrojom [29, 40, 41].

Biosyntéza vanilínu a jeho derivátov mikroorganizmami, najmä baktériami, boli dobre študované. Vanilín je pre baktérie toxický kvôli svojej reaktívnej aldehydovej skupine, preto sa premieňa na kyselinu vanilovú pričom je táto reakcia katalyzovaná vanilínaldehydázou, nasledovaná dekarboxyláciou na guaiakol dekarboxylázou kyseliny vanilovej. Okrem oxidačných ciest môže byť kyselina vanilová tiež dimetylovaná na kyselinu protokatechovú vanilát-o-dimetylázou oxidoreduktázou alebo hydroxylovaná na metoxyhydrochinón vaniláthydroxylázou. Zdá sa ale že druhý prípad nie je pre baktérie bežný. Premena smerom k metoxyhydrochinónu sa zdá byť bežná skôr v hubách oproti baktériam [41].



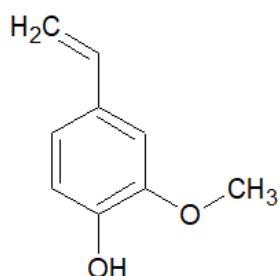
Obrázok 9: Štruktúrny vzorec vanilínu [42]

2.2.4.5 4-vinylguaiacol

Zlúčenina 4-vinylguaiacol (4-VG) je obzvlášť cenným produktom v potravinárskom priemysle, ktorá má štipľavú vôňu podobnú klinčeku. Vzniká napríklad pri metabolickej aktivite pивných kvasieniek z kyseliny ferulovej alebo vzniká aj pri tepelnom spracovaní pri výrobe piva. Ďalším

zdrojom 4-VG môže byť napríklad japonské saké, tradičný alkoholický nápoj, ktorý sa vyrába z leštenej ryže, koji ryže a vody. Kyselina ferulová sa pri tejto výrobe uvoľňuje zo zrn ryže počas fermentačného procesu a môže sa premeniť na kyselinu vanilovú, ktorú je možné ďalej transformovať na 4-VG druhmi *Staphylococcus* alebo *Bacillus*. Používa sa aj ako východiskový materiál na výrobu chemických komodít ako je vanilín a v oftalmickej oblasti na prípravu roztokov obsahujúcich aromatické látky. 4-VG je navyše kľúčovým východiskovým materiálom pre biokatalytickú výrobu ďalších dôležitých chemikálií, ako je acetovanilon a etylguaiakol, ako aj predchodca chemickej syntézy biologicky odbúrateľných vysoko pevných oksyločených polystyrénov [29, 43, 44, 45].

Komerčný 4-VG sa v súčasnosti získava chemickou dekarboxyláciou kyseliny ferulovej pomocou kovových katalyzátorov za vysokých hodnôt pH, čo vyvoláva obavy o bezpečnosť produktu a nebezpečné odpady. Použitie mikroorganizmov ako biokatalyzátorov za miernych podmienok preto poskytuje sľubnú metódu na výrobu 4-VG. Najbežnejšími mikroorganizmami, ktoré boli použité na biotransformáciu, sú baktérie *Streptomyces setonii*, *Cupriavidus* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp. a *Lactobacillus farciminis* [46].



Obrázok 10: Štruktúrny vzorec 4-vinylguaiacolu [47]

2.3 Mikrobiálna transformácia fenolových zlúčenín

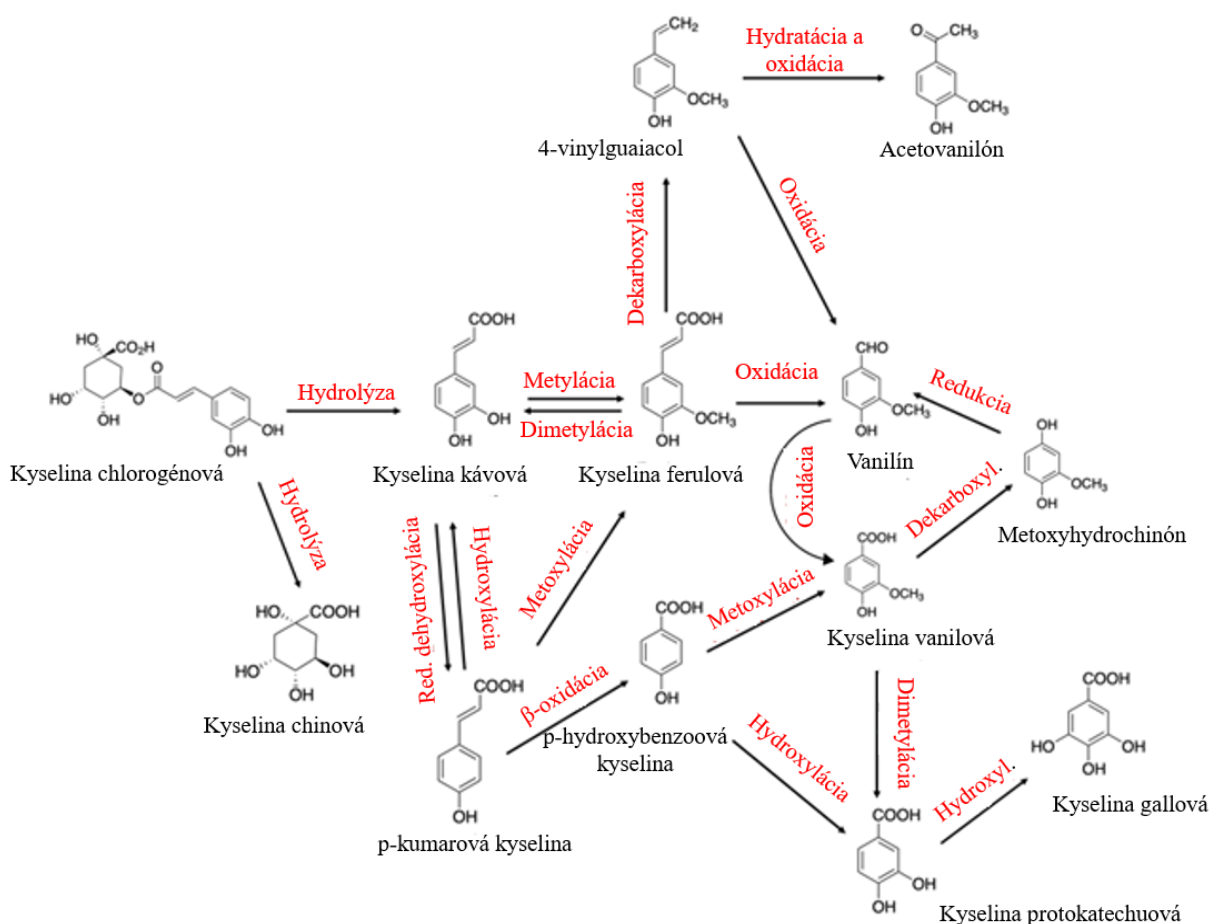
Fenol ako antimikrobiálne činidlo je pre mnohé mikroby toxická zlúčenina. Existujú však niektoré mikroby, ktoré sú odolné voči fenolu a majú schopnosť ho degradovať. Nie je to však jednoduchý proces na štandardizáciu a prevedenie do praxe, pretože proces degradácie je komplikovaný prítomnosťou derivátov fenolu. Niektoré funkčné skupiny na fenole, ako je nitroskupina, metylová skupina a aminoskupina, sťažujú degradáciu, zatiaľ čo iné skupiny, ako je karboxylová skupina a hydroxylová skupina, ju uľahčujú. Mikrobiálna degradácia fenolu nezávisí len od substrátu, ktorý má byť degradovaný, ale aj od stavu mikroorganizmu, ako aj od faktorov prostredia. Fenol môže byť degradovaný mikróbmi aeróbnymi aj anaeróbnymi cestami [48].

2.3.1 Mikrobiálna transformácia kyseliny ferulovej

Jednou z vhodných zlúčenín na biotransformáciu je napríklad kyselina ferulová, z ktorej môže vzniknúť kyselina vanilová, vanillylakohol, vanilín, 4-vinylguaiakol a tie môžu ďalej degradovať za vzniku ďalších zlúčenín. Biokonverziu kyseliny vanilovej na vanilín je možné dosiahnuť napríklad pomocou fermentácie s využitím huby *Phanerochaete chrysosporium*. Rejani a kol. uviedli, že táto vlákňitá huba katalyzuje aeróbnou biokonverziu kyseliny ferulovej na vanilín. V tejto reakcii, dochádza k prvým dekarboxylačným reakciám, kde sa kyselina ferulová premení na 4-vinylguaiakol ako medziprodukt a potom je tento medziprodukt priamo premenený na kyselinu vanilovú, ktorej redukcia vedie k produkcii vanilínu (Obrázok 11). Max

a kol. opísali ďalšiu biokonverznú dráhu pre *Streptomyces setonii*, kde sa ferulová kyselina premenila na 4-vinylguaiacol dekarboxyláciou a potom oxidatívnou dvojuhlíkovou fragmentáciou bočného reťazca došlo k výťažku vanilínu [48, 49, 50, 51].

Ďalej existuje množstvo ciest, ktoré degradujú kyselinu vanilovú za vzniku vanilínu. Uvádza sa, že vanilová kyselina sa môže premeniť na kyselinu protokatechuovú dimetyláciou metoxy-p-hydrochinónu a následnou oxidačnou dekarboxyláciou a redukciami na vanilín a vanilylalkohol (Obrázok 11). Je možné využiť aj mikrobiálny metabolizmus na premenu vanilínu na kyselinu vanilovú oxidáciou. Táto transformácia bola tiež vysvetlená dekarboxyláciou kyseliny ferulovej na 4-vinylguaiacol pôsobením dekarboxylázy kyseliny ferulovej, zatiaľ čo hydratácia 4-vinylguaiacolu, po ktorom nasleduje oxidácia jeho bočného reťazca, viedla k acetovanilónu [48, 49, 50].



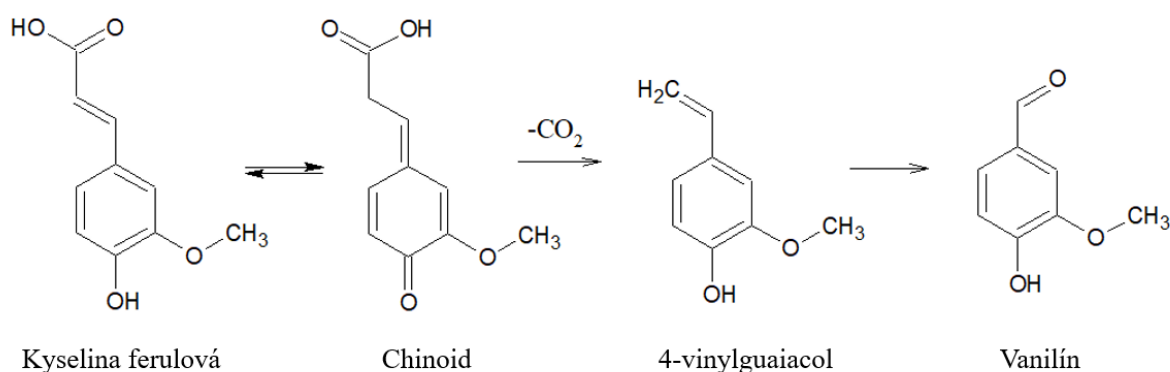
Obrázok 11: Biokonverzia kyseliny ferulovej a ďalších fenolových zlúčenín [50]

2.3.1.1 Neoxidačná dekarboxylácia

Neoxidačná dekarboxylácia aromatických kyselín sa vyskytuje v rade mikroorganizmov a je zaujímavá pre biologické spracovanie a metabolické inžinierstvo. V mikroorganizmoch vykonáva neoxidačnú dekarboxyláciu aromatických zlúčenín enzým dekarboxyláza, ktorý nevyžaduje žiadne kofaktory na dekarboxyláciu kyseliny ferulovej a neobsahuje žiadne prostetické skupiny. Tieto vlastnosti robia dekarboxylázu atraktívnym enzýmom pre jeho použitie ako biokatalyzátora v rôznych aplikáciách. Aj keď dekarboxylázy kyseliny ferulovej poskytujú užitočné nástroje pre priemyselné aplikácie, molekulárne základy fungovania týchto enzýmov sa len začínajú skúmať. Vzhľadom na záujem o použitie dekarboxyláz z aromatických

kyselín v rôznych aplikáciách bola vo výskume Mohammad Wadud Bhuiya a spol. študovaná štruktúra dekarboxylázy kyseliny ferulovej (FDC1) a jej štruktúra bola podobná doméne proteínu UbiD, z ktorej vzniká elektrónový prenášač ubichinon. Kryštalizácia z dekarboxylovaného reakčného produktu identifikovala veľkú nepolárnu dutinu ako aktívne miesto enzýmu a naznačovalo katalytický mechanizmus pre neoxidačnú dekarboxylačnú reakciu aromatických substrátov [44, 52].

Kyselina ferulová sa pri neoxidačnej dekarboxylácii katalyzovanej enzýmom dekarboxylázy kyseliny ferulovej konvertuje cez chinoidový medziprodukt na 4-vinylguaiacol (4-VG) a vanilín (Obrázok 12). Tento typ dráhy bol pozorovaný v mnohých hubách a kvasinkách a tiež v niektorých baktériách [53, 54].

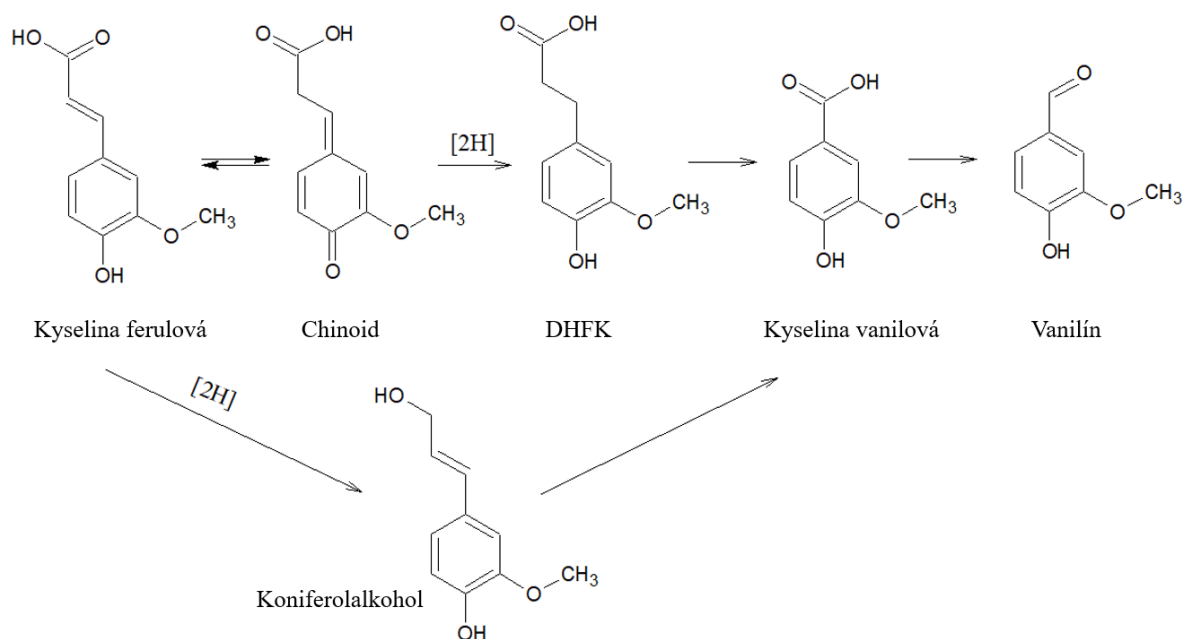


Obrázok 12: Konverzia kyseliny ferulovej na vanilín neoxidačnou dekarboxylačnou cestou [54]

2.3.1.2 Redukcia postranného reťazca

Ďalším navrhovaným mechanizmom je redukcia bočného reťazca kyseliny ferulovej za vzniku kyseliny vanilovej, ktorá sa môže konvertovať na vanilín. Táto reakcia, typická pre anaeróbnú degradáciu, prebieha cez chinoidový medziprodukt, ktorý sa po hydridovom útoku mení na dihydroferulovú kyselinu (DHFK) (Obrázok 13) [54].

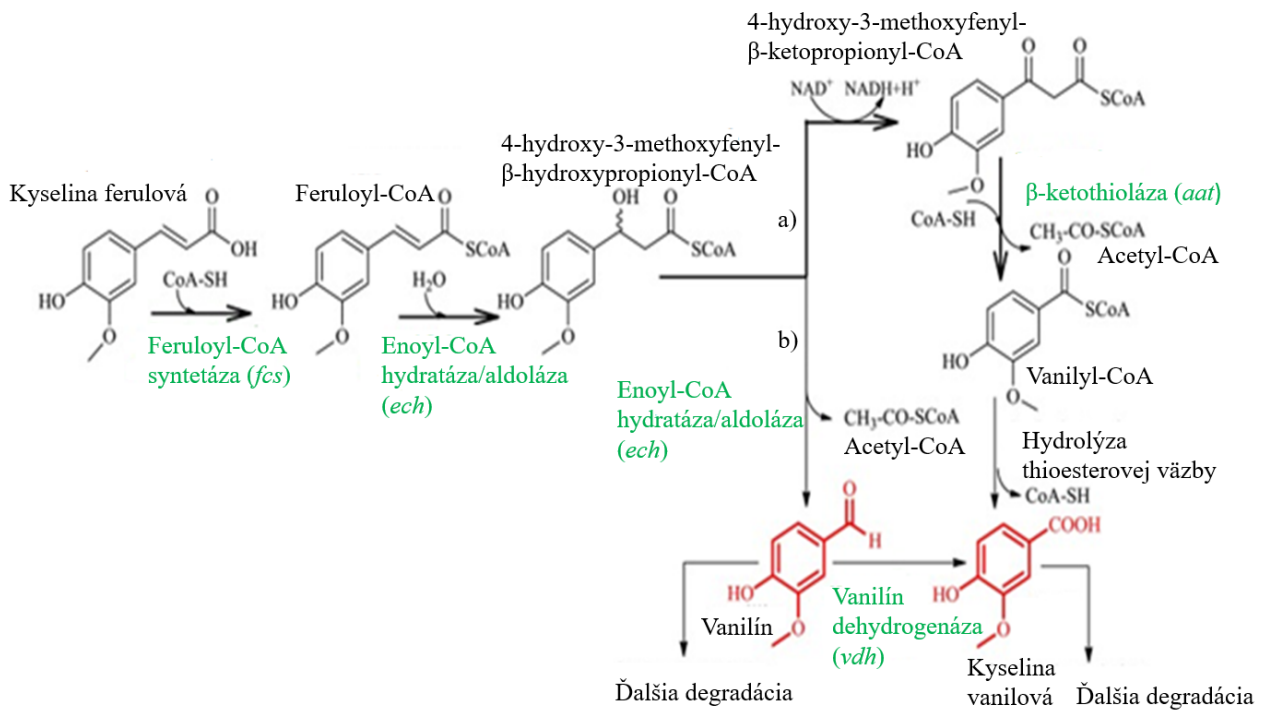
Bolo dokázané, že pri niektorých hubách, ako napríklad *Trametes* sp., *Sporotrichum pulverulentum* a *Pycnoporus cinnabarinus* bol odlišný redukčný mechanizmus, v ktorom vzniká po hydridovom útoku na kyseline ferulovej ako prvý koniferylalkohol, ktorý je následne prevedený na kyselinu vanilínovú a ďalšie deriváty. Táto redukčná dráha je však u viacerých mikroorganizmov potlačená prítomnosťou akceptorov vodíka, ako je dusičnan, fumarát alebo kyslík [54].



Obrázok 13: Konverzia kyseliny ferulovej na vanilín cestou redukcie bočného reťazca [54]

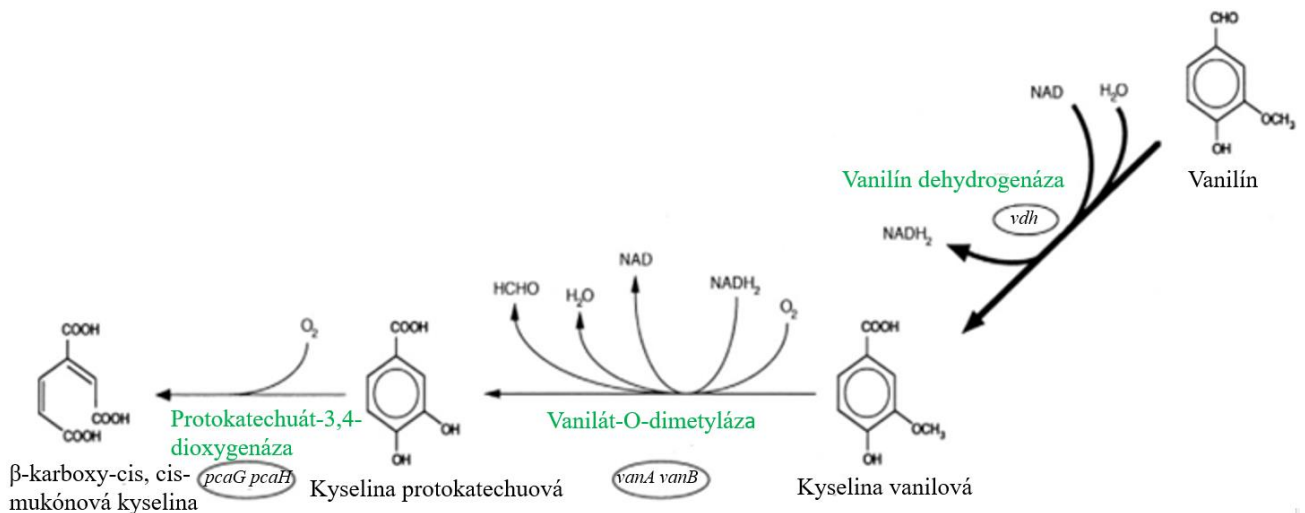
2.3.1.3 β -oxidácia kyseliny ferulovej

Najdetailnejšou cestou premeny kyseliny ferulovej na kyselinu vanilovú alebo vanilín v mikroorganizmoch je pravdepodobne proces β -oxidácie, ktorý je analogický s β -oxidáciou mastných kyselín. Kyselina ferulová je prevedená pomocou CoA thioesteru a feruloyl-CoA syntetázy (kódovanej génmi *fcs*) na feruloyl-CoA, ktorý je následne hydratovaný na nestabilný produkt 4-hydroxy-3-metoxifenyl- β -hydroxypropionyl-CoA pomocou feruloyl-CoA hydratázy-lyázy (aldolázy) (kódovanej génmi *ech*). V prvej ceste dochádza k thioklastickému štiepeniu 4-hydroxy-3-metoxifenyl- β -ketopropionyl-CoA na acetyl-CoA a vanillyl-CoA, ktoré je katalyzované β -ketotiolázou (kódovanou *aat* génmi) a hydrolýzou thioesterovej väzby vzniká kyselina vanilová (Obrázok 14, cesta a)). Druhou cestou β -oxidácie kyseliny ferulovej v mikroorganizmoch je mechanizmus, v ktorom dochádza k hydratácii a štiepeniu 4-hydroxy-3-metoxifenyl- β -hydroxypropionyl-CoA na vanilín a acetyl-CoA (Obrázok 14, cesta b)). Enzým enoyl-CoA hydratáza / aldoláza je teda zodpovedný za katalýzu oboch reakcií [55, 56, 57].



Obrázok 14: β -oxidácia kyseliny ferulovej za vzniku vanilínu a kyseliny vanilovej, kde tenké šípky označujú β -oxidačnú dráhu a tučné šípky označujú β -neoxidačnú degradáciu [55].

Ďalšia degradácia vanilínu a kyseliny vanilovej, ktoré vznikli β -oxidáciou kyseliny ferulovej, prebieha nasledujúcimi krokmi (Obrázok 15). Vanilín je oxidovaný na kyselinu vanilovú vanilín dehydrogenázou, kódovaná génom *vdh* a ďalej vanilát-O-demetyláza, kódovaná génmi *vanA* a *vanB*, katalyzuje premenu kyseliny vanilovej na kyselinu protokatechovú, ktorá sa ďalej metabolizuje štiepením v polohe orto [57].



Obrázok 15: Degradácia vanilínu a kyseliny vanilovej [57]

2.3.2 Faktory ovplyvňujúce biotransformáciu fenolických zlúčenín

Osud fenolových zlúčenín prítomných behom mikrobiálnych fermentácií závisí predovšetkým od druhu mikroorganizmu. Avšak, biotransformáciu ovplyvňujú aj parametre fermentačného procesu konverzie fenolických zlúčenín. Kinetika substrátu mikroorganizmami

väčšinou závisí od fermentačných podmienok, ako je aktivita vody, pH, teplota a dostupnosť kyslíku. Navyše vlastnosti substrátu ako napríklad veľkosť častíc, biologická odbúrateľnosť, absorpcia vody a zloženie chemických látok tiež ovplyvňujú výťažok fenolických zlúčenín [50].

2.3.2.1 Teplota a pH

Teplota je najdôležitejším faktorom, ktorý treba zväžiť na kontrolu mikrobiálneho rastu. Obsah fenolických zlúčenín môže klesať pri vysokej teplote a po dlhom čase fermentácii, pretože degradácia fenolických zlúčenín môže nastať pri vysokej teplote a hodnote pH odchyľujúcej sa od optimálnej hodnoty. Optimálne pH hrá kľúčovú úlohu pri zvyšovaní obsahu fenolických zlúčenín, keďže úzko súvisí s rastom mikrobov, enzýmovou sekréciou, aktivitou enzýmov a štrukturálnych zmien fenolických zlúčenín. Hodnota pH fermentačného média jasne závisí od teploty fermentácie, času a druhu mikroorganizmu. Katina a kol. uvádzajú, že silne kyslé podmienky (pH 3,9 – 4,1) znížili obsah voľnej kyseliny ferulovej v ražných otrubách fermentovanými baktériami mliečneho kvasenia, kvôli inhibícii esterázy kyseliny škoricovej, ktorá uvoľňuje kyselinu ferulovú zo štruktúry hemicelulózy. Najvyšší obsah kyseliny ferulovej z ražných otrúb bol dosiahnutý pri pH hodnote 6 – 6,5, čo je blízko k optimálnemu pH esterázy kyseliny škoricovej [50].

2.3.2.2 Obsah kyslíka

Mikrobiálny rast je ovplyvnený množstvom preneseného kyslíka, ktorá môže ovplyvniť degradáciu fenolov. Môže dôjsť k degradácii fenolických zlúčenín aeróbnymi a anaeróbnymi cestami. Aeróbne reakcie sú opísané adíciou OH skupiny pôsobením monooxygenázy za vzniku dihydroxy produktu. Pri anaeróbnom metabolizme fenolických zlúčenín hrá dôležitú úlohu redukčné odstránenie aromatických OH skupín [50].

2.3.2.3 Koncentrácia substrátu

Počiatočná koncentrácia substrátu a akumulácia konečných produktov v kultivačnom médiu môže inhibovať výťažok biokonverzie. Zheng a kol. ukázali, že keď počiatočná koncentrácia kyseliny ferulovej sa zvýšila zo 4 g/l na 6 g/l pri fermentácii zvyškov oleja z ryžových otrúb pomocou *A. niger* a *Pycnoporus cinnabarinus*, výťažok kyseliny vanilovej sa znížil z 57,7 % hm. na 42 % hm. Ďalšie zvýšenie počiatočnej koncentrácie kyseliny ferulovej v kultivačnom médiu spôsobila inhibíciu substrátu. Schopnosť tolerovať a metabolizovať fenolické zlúčeniny závisí od kmeňa alebo druhu mikroorganizmu. Napríklad baktérie mliečneho kvasenia môžu metabolizovať fenolické kyseliny prostredníctvom kmeňovo špecifickej dekarboxylázy alebo reductáz [50].

2.4 Súčasný výskum v oblasti biotransformácie fenolových látok pomocou termofilných mikroorganizmov

Termofilná baktéria *Schlegelella thermodepolymerans* doposiaľ nebola detailne preštudovaná. V predošlých kapitolách bola zmienená štúdia, ktorá sa zaoberala charakterizáciou a klasifikáciou *Schlegelella aquatica*. Táto štúdia by mohla byť vhodným zdrojom pre budúci výskum vlastností *S. thermodepolymerans*. Ďalej bol spomenutý výskum v ktorom bola skúmaná *S. thermodepolymerans* ako vhodný kandidát na syntézu PHA s využitím xylózy ako zdroja uhlíku a posledným zmieným článkom bol úspešne sekvenovaný genóm baktérie *S. thermodepolymerans*, čo môže prispieť k ďalšiemu pokročilejšiemu výskumu tejto

termofilnej baktérie a to napríklad aj v riešenej problematike biotransformácie fenolových zlúčenín [11, 12, 13, 14].

Výskumom využitia termofilných mikroorganizmov na biotransformáciu fenolových zlúčenín sa zaoberal napríklad Topakas a kol. Tento článok popisuje biotransformáciu kyseliny ferulovej na kyselinu vanilovú pomocou termofilnej huby *Sporotrichum thermophile*. Metabolizmus kyseliny ferulovej termofilom *S. thermophile* prebiehal prostredníctvom degradácie propénového reťazca za vzniku 4-vinylguaiakolu, ktorý sa pravdepodobne ďalej metabolizoval na kyselinu vanilovú. Okrem vyššie uvedených medziproduktov bol detegovaný aj guaiakol, zvyčajne ako výsledok neoxidačnej dekarboxylácie kyseliny vanilovej. Biokonverzia kyseliny ferulovej na kyselinu vanilovú bola ovplyvnená množstvom spracovanej kyseliny ferulovej a zdrojom uhlíka, na ktorom bola biomasa pestovaná. Pri optimálnych podmienkach boli termofilnou hubou *S. thermophile* získané vysoké výťažky kyseliny vanilovej konverziou kyseliny ferulovej [58].

V súčasnom výzume využitia termofilných baktérii na biotransformáciu fenolových zlúčenín je zaujímavá aj napríklad práca od Mpofo a kol., ktorí využili *Bacillus licheniformis*. *Bacillus licheniformis* kmeň TAB7 je termofil, ktorý bol izolovaný z kompostovaných exkrementov hospodárskych zvierat v Japonsku. Ukázalo sa, že má schopnosť deodorizovať mastné kyseliny s krátkym reťazcom, ako je kyselina valérová, maslová, propiónová a príbuzné kyseliny zodpovedné za nepríjemný zápach v hnoji. Bol tu vyvinutý proces kompostovania využívajúci kmeň TAB7 ako kompost-dezodoračné činidlo. Bola hodnotená schopnosť kmeňa TAB7 biotransformovať fenolové zlúčeniny, ako sú monocyklické hydroxyškoricové kyseliny (napr. kyselina ferulová a kávová) a hydroxybenzoové kyseliny (napr. kyselina vanilová, protocatechová a vanilín). Tieto fenolové zlúčeniny sú totižto dôležité environmentálne znečisťujúce látky, ktoré sa hojne vyskytujú v kompostovacom materiáli. Kmeň TAB7 dokázal transformovať kyselinu ferulovú, kumarovú (do 6 hodín) a kávovú (do 24 hodín). Produktom biotransformácie kyseliny ferulovej bol 4-vinylguaiacol, ktorý je prekursorom ďalších zlúčenín ako vanilín alebo kyselina vanilová. 4-vinylguaiacol bol taktiež produktom transformácie kyseliny kumarovej a u kyseliny kávovej došlo dokonca k vzniku 4-ethylcatecholu [59].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

V rámci experimentálnej časti tejto diplomovej práce sa pracovalo s baktériami rodu *Schlegelella*. Konkrétne *Shlegelella thermodepolymerans* M 15344, DSM 15344, DSM 15264 a LMG 21645. K produkčným médiám bola pridaná kyselina ferulová a pri odberoch bola zmeraná optická hustota (OD) a pH. Po odberoch supernatantu bol pozorovaný transformačný potenciál týchto baktérii na HPLC. Po odberoch sušiny bolo gravimetricky zistené množstvo biomasy a prebehla analýza na GC-FID, kde sa vyhodnotilo vyprodukované množstvo P3HB. Experimentálna časť bola ukončená bioinformatickou analýzou transformácie kyseliny ferulovej baktériou *S. thermodepolymerans* DSM 15344, ktorá sa zaoberala génmi kódujúcich enzýmy zodpovednými za priebeh biotransformačných reakcií FA.

3.1 Použité baktérie, chemikálie a prístroje

3.1.1 Použité baktérie

V experimentálnej časti práce boli použité baktérie *Shlegelella thermodepolymerans* M 15344, DSM 15344, DSM 15264 a LMG 21645. Kmeň M 15344 je pôvodný kmeň DSM 15344, ktorý bol lyofilizovaný v českej zbierke mikroorganizmov. Modelový kmeň DSM 15344 a kmeň DSM 15264 pochádzajú z nemeckej zbierky a LMG 21645 pochádza z belgickej zbierky mikroorganizmov.

3.1.2 Použité chemikálie

- 4-vinyguaiacol, Sigma-Aldrich (DE)
- Bromid sodný, NaBr, Lachema (ČR)
- Citrát amonno-železitý $\text{Fe}^{(III)}\text{NH}_4$ citrate, Fluka (CHE)
- Chlorid amonný NH_4Cl , Lach-Ner (ČR)
- Chlorid vápenatý dihydrát, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Lachema (ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4
- Hydrogenuhlíčan sodný, NaHCO_3 , Lach-Ner (ČR)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Lach-Ner (ČR)
- Kyselina ferulová (*trans*), Sigma-Aldrich (DE)
- Kyselina vanilová, Sigma-Aldrich (DE)
- LB medium, SERVA (DE)
- Nutrient Broth w/1% peptone, HiMedia (IND)
- Síran hořečnatý heptahydrát, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Lach-Ner (ČR)
- Rostok stopových prvkov TES III
- Tryptone ES, HiMedia (IND)
- Vanilín, Sigma-Aldrich (DE)
- Vanilylalkohol, Sigma-Aldrich (DE)
- Xylóza

3.1.3 Použité vybavenie a prístroje

- Analytické váhy PA224C, Pioneer (CH)
- Blokový termostat Stuart SBH 130 – Bibby Scientific
- Blokový termostat Stuart SBH 200D – Bibby Scientific

- Centrifuga U-32R, Boeco (DE)
- Kvapalinový chromatograf Shimadzu (JP)
- Mikrostriekačka Hamilton 250 µl
- Laminárny box Aura mini, Bio air instruments
- LUT Syringe Filters PES (30mm, 0,45µm, pk/100)
- Magnetická miešačka Magnetic stirrer, BIOSAN
- Nanofotometer P 300, Implen
- pH meter, pHTestr 30, Thermo Scientific (Nizozemí)
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300
- Temperovaná trepačka, LABWIT ZWYR-D2401
- Vortex BENCHMIXER, Benchmark Scientific Inc.
- Bežné laboratórne sklo a vybavenie

3.2 Postup kultivačných experimentov s kyselinou ferulovou

Boli prevedené kultivačné experimenty so 4 kmeňmi baktérie *Shlegelella thermodepolymerans*:

- M 15344
- DSM 15344
- DSM 15264
- LMG 21645

Bolo použité minerálne médium do ktorého bola pridaná kyselina ferulová. Počas kultivácie a po kultivácii došlo k odberom vzoriek – supernatant na pH a vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu (HPLC), kultúra na zmeranie optickej hustoty a vysušený pelet biomasy na plynovú chromatografiu s plameňovo ionizačným detektorom (GC-FID).

3.2.1 Kultivácia v živnom médiu

Na živné médium bolo v experimentoch použité LB médium o koncentrácii 20 g/l v destilovanej vode alebo Nutrient broth (NB) o koncentrácii 25 g/l v destilovanej vode. Objem média v 100 ml Erlenmeyerovej banke bol 50 ml a očkovanie prebehlo v dvoch Erlenmeyerových bankách z kryokonzervy obsahujúcej vybrané mikroorganizmy v 10% glycerole, ktorý slúžil ako kryoprotektant. Kultivácia prebiehala 24 hodín, pri 50 °C a konštantnom trepaní 180 rpm (orbit 20 mm).

3.2.2 Kultivácia v produkčnom médiu

K produkcii P3HB a zisku látok s pridanou hodnotou pomocou biotransformačných experimentov bolo použité minerálne médium, pracovne nazývané ako chelatococové. Objem média v 250 ml Erlenmeyerovej banke bol 100 ml, kultivácia prebiehala po dobu 72 hodín, pri 50 °C, 180 rpm (orbit 22 mm). Zloženie média bolo nasledujúce:

- | | |
|--|------------|
| • Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O | 9,0 g/l |
| • KH ₂ PO ₄ | 1,5 g/l |
| • NH ₄ Cl | 1,0 g/l |
| • MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,2 g/l |
| • CaCl ₂ · 2 H ₂ O | 0,02 g/l |
| • Fe ^(III) NH ₄ citrate | 0,0012 g/l |

- trypton 0,5 g/l

Roztok stopových prvkov (TES II) o $c = 1$ ml/l bol pridaný po sterilizácii média, zloženie:

- EDTA 50,0 g/l
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 13,8 g/l
- ZnCl_2 0,84 g/l
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,13 g/l
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/l
- $\text{MnCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,016 g/l
- H_3BO_3 0,1 g/l

Ďalej boli separátne pripravené a vysterilizované uhlíkaté substráty. Bola použitá výsledná koncentrácia xylózy 20 g/l.

Produkčné médium bolo zaočkované 10 obj. % inokula v prípade všetkých kmeňov okrem kmeňa DSM 15344, kde bolo produkčné médium zaočkované 5 obj. % inokula.

K minerálnym médiám bola pridaná kyselina ferulová ešte pred sterilizáciou a v prípade posledného experimentu bola kyselina ferulová pridaná až po sterilizácii. Každý experiment mal tri alebo dve repetície.

3.2.3 Odbery vzoriek spojené so stanovením pH a hodnotením rastu kultúry

Odbery vzoriek boli v závislosti od náplne experimentu prevedené po 0 (hneď po zaočkovaní produkčného média), 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72 a 168 hodinách.

Pri jednotlivých odberoch bolo zmerané pH na pH metri a optická hustota na spektrofotometri. Rast biomasy bol stanovovaný spektrofotometricky pri 600 nm v plastových kyvetách. Ako blank bola použitá destilovaná voda. Podľa potreby bola vzorka vhodne nariadená s destilovanou vodou tak, aby hodnota absorbcie nepresahovala 1,000.

3.2.4 Stanovenie sušiny – biomasa a P3HB

Sušina bola stanovená gravimetricky. Bolo odobratých 2×10 ml kultúry do centrifugačných skúmaviek s guľatým dnom a centrifugovalo sa ($6\,000 \times g$) 5 min. Supernatant bol uchovaný pre ďalšie analýzy (HPLC-UV-Vis). Usadený pelet bol premytý v destilovanej vode a opäť prebehla centrifugácia za rovnakých podmienok. Pelet sa nechal sušiť do konštantnej hmotnosti pri 70 °C. Následne bol pelet zvážený na analytických váhach a využil sa na ďalšiu analýzu (stanovenie obsahu P3HB v biomase pomocou GC-FID).

Stanovenie obsahu P3HB bolo nasledujúce. Do krimpovacích vialiek bolo navážených 8–11 mg suchej biomasy. Následne bolo do každej vialky pridaných 1 ml chloroformu a 0,8 ml esterifikačnej směsi (15% kyselina sírová v metanole s vnútorným štandardom kyseliny benzoovej o koncentrácii 5 mg/ml). Krimpovacie vialky boli hermeticky uzatvorené a následne prebiehala esterifikácia pri 94 °C po dobu 3 hodín. Takto vznikli prchavé methylestery, ktorých obsah bolo možné pomocou plynovej chromatografie stanoviť.

Po ukončení esterifikácie boli krimpovacie vialky krátko ochladené a ich obsah bol prevedený do väčších skrutkovacích vialiek, ktoré obsahovali 0,5 ml 50 mM hydroxidu sodného. Skrutkovacie vialky boli uzatvorené a ich obsah pretrepaný. V tomto kroku došlo k neutralizácii

a extrakcii vzorky. V momente kedy došlo k viditeľnému oddeleniu dvoch fází, bolo odpipetovaných 50 µl ze spodnej (chloroformovej) fáze do malých skrutkovacích vialiek, ktoré obsahovali 900 µl izopropylalkoholu. Malé skrutkovacie vialky boli uzatvorené a následne ich obsah bol podrobený analýze pomocou plynovej chromatografie s plameňovo ionizačným detektorom (GC-FID).

3.2.5 Stanovenie supernatantu na HPLC

Zo supernatantu boli stanovené vznikajúce fenolové zlúčeniny s pridanou hodnotou. Supernatant bolo nutné pred analýzou na HPLC s UV-Vis detektorom prefiltrovať cez nylonové filtre s 0,45 µm pórmí. Vzorky boli následne ručne injektované do injekčného ventilu HPLC pomocou 250 µl Hamilton striekačky. Podmienky separácie sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1: Použité parametre metódy HPLC

Kolóna	Kinetex® 2,6 µm EVO C18 100 Å (LC Column 100 x 3,0 mm)
Mobilná fáza	Acetonitril: 0,1% kyselina octová (15:85)
Prietok mobilnej fáze	0,3 ml/min
Teplota	35°C
Tlak	250 bar
Doba analýzy	27 minút
Typ elúcie	Izokratická elúcia
Detekcia	230-450 nm Vanilylalkohol, 4-vinylguaiacol – 230 nm Kyselina vanilová, vanilín – 280 nm Kyselina ferulová – 330 nm
Detektor	UV/Vis

Pred analýzou bola prevedená kalibrácia so štandardami vanilylalkoholu, kyseliny vanilovej, kyseliny ferulovej, vanilínu a 4-vinylguaiacolu v methanole o koncentracii 100 mg/l, 250 mg/l, 400 mg/l a 500 mg/l. Ďalej bola zostrojená kalibračná krivka, ktorá slúžila na vypočítanie koncentrácie z integrovaných hodnôt plochy z HPLC analýzy (kalibračné krivky a ukážkové chromatogramy sa nachádzajú v prílohách tejto práce – str. 67). Z nameraných koncentrácií bola pre lepšie vyjadrenie biotransformačnej premeny vypočítaná látková konverzia kyseliny ferulovej na jej metabolity. Výpočty konverzie vychádzali z koncentrácie kyseliny ferulovej zmeranej v čase 0 hodín.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Kultivačné experimenty bakteriálnych kmeňov M 15344, DSM 15264 a LMG 21645 s kyselinou ferulovou

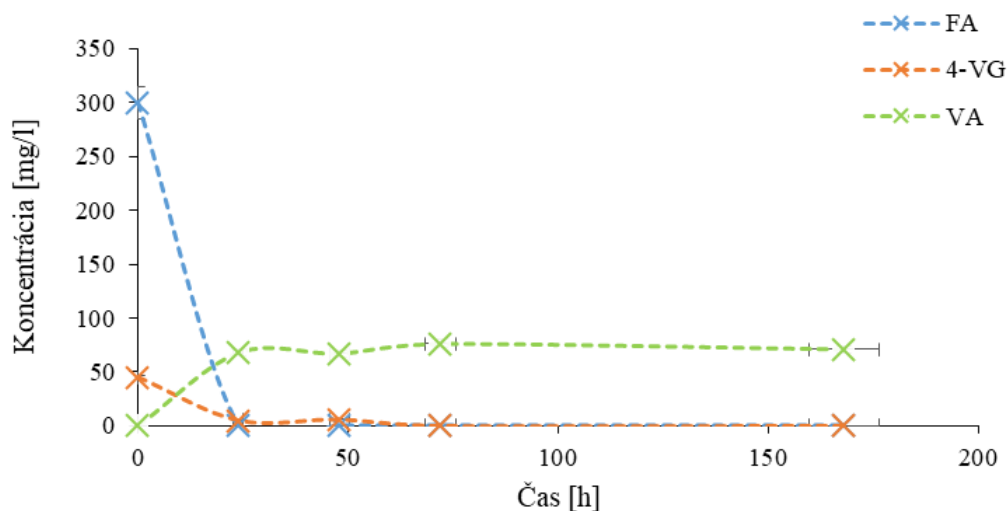
Prvým experimentom bola kultivácia 3 kmeňov baktérie *Shlegelella thermodepolymerans*: M 15344, DSM 15264 a LMG 21645 s kyselinou ferulovou o koncentrácii 300 mg/l. Každý bakteriálny kmeň mal tri repetície a meranie na HPLC prebehlo pre každú vzorku dvakrát.

Na kultiváciu bolo použité živné médium LB o koncentrácii 20 g/l v destilovanej vode a minerálne médium. Odbery supernatantu a biomasy prebehli v čase 0, 24, 48, 72 a 168 hodín pričom bolo zmerané pH a optická hustota. Hodnoty pH vzoriek vrámci všetkých vykonaných experimentov sa pohybovali v rozmedzí 6–7, kde nižšie hodnoty pH boli namerané vo vzorkách s vyššou koncentráciou kyseliny ferulovej a vo vzorkách s neskorším časom odberu.

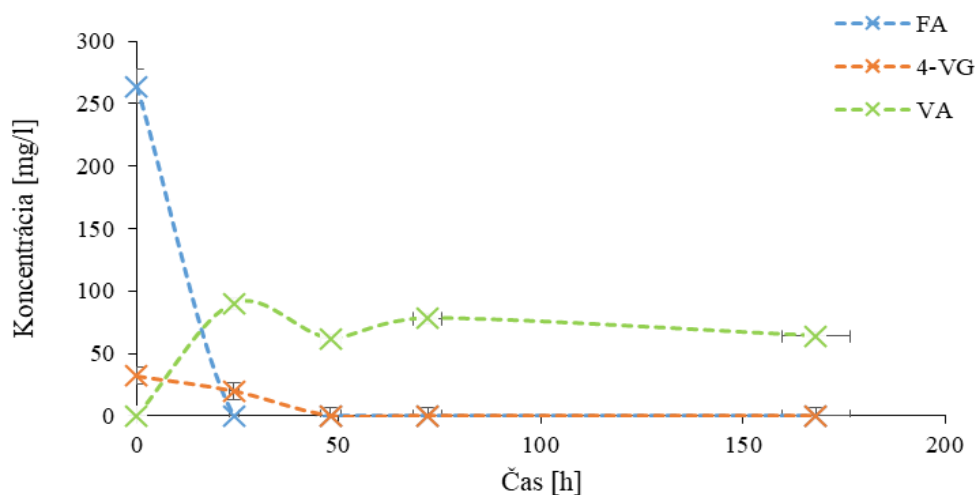
Po kultiváciach bol supernatant analyzovaný na HPLC-UV-Vis a vysušený pelet biomasy na GC-FID.

4.1.1 Priebeh biotransformácie FA bakteriálnymi kmeňmi M 15344, DSM 15264 a LMG 21645

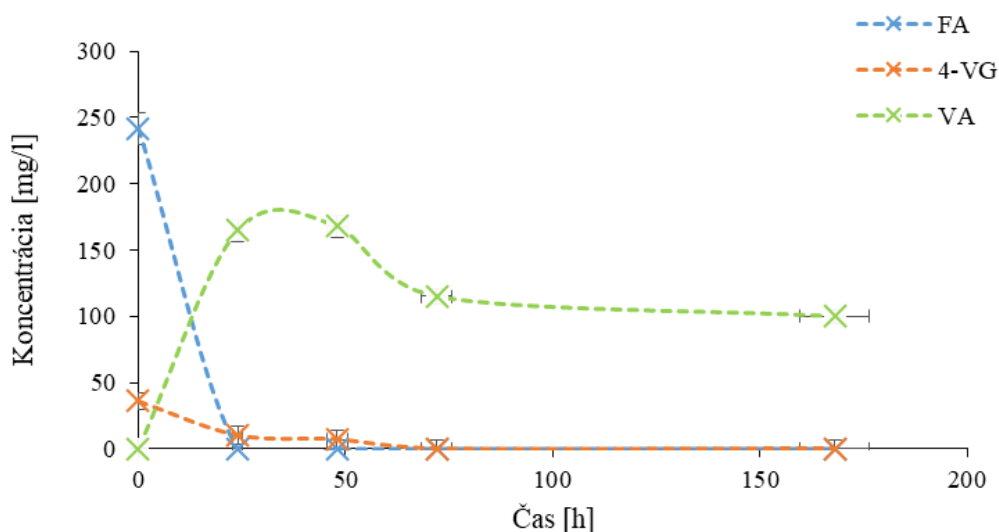
Nasledujúce grafy zobrazujú časový vývoj úbytku kyseliny ferulovej a tvorbu jednotlivých metabolitov pri kyseline ferulovej o koncentrácii 300 mg/l tromi kmeňmi *S. thermodepolymerans*.



Obrázok 16: Koncentrácia kyseliny ferulovej a jej metabolitov po biotransformácii pre bakteriálny kmeň M 15344



Obrázok 17: Koncentrácia kyseliny ferulovej a jej metabolitov po biotransformácii pre bakteriálny kmeň DSM 15264



Obrázok 18: Koncentrácia kyseliny ferulovej a jej metabolitov po biotransformácii pre bakteriálny kmeň LMG 21645

Tabuľka 2: Priemerná biokonverzia fenolových látok pre 3 kmene *S. thermodepolymerans*

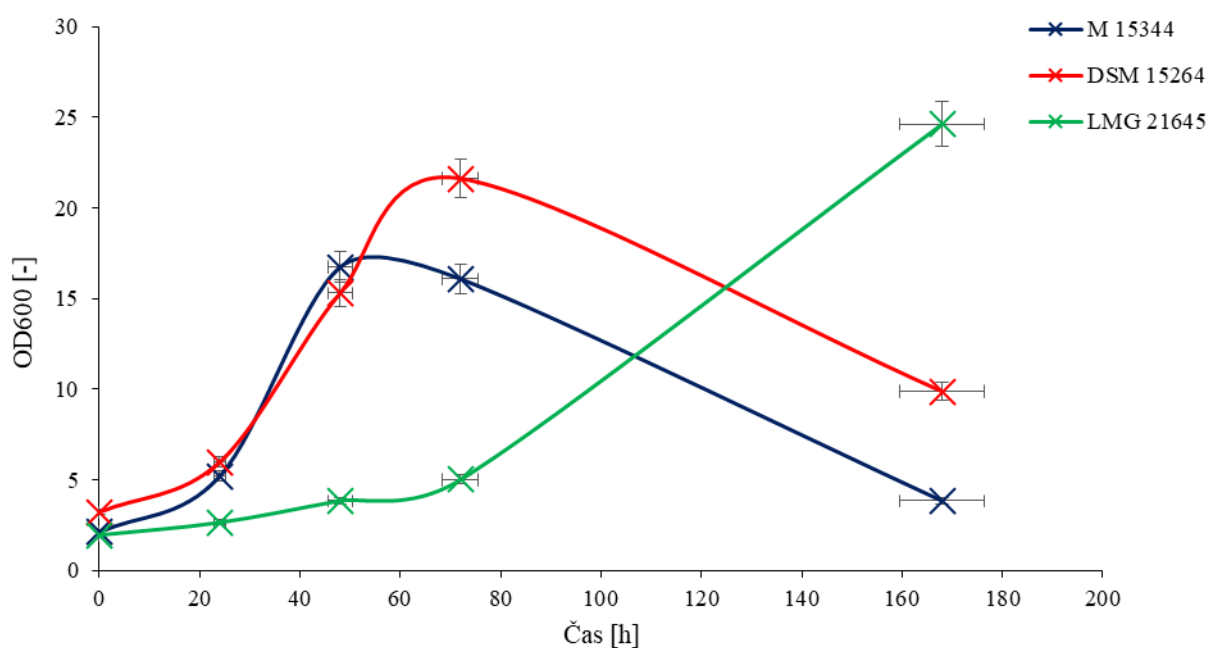
Kmeň	Priemerná biokonverzia VA
M 15344	25 %
DSM 15264	28 %
LMG 21645	58 %

Kyselina ferulová bola kompletne metabolizovaná do 24 hodín u všetkých bakteriálnych kmeňov. Bakteriálne kmene M 15344, DSM 15264 a LMG 21645 teda preukázali rýchle spracovanie kyseliny ferulovej za vzniku iných fenolových metabolitov.

V čase 0 hodín bol zaznamenaný 4-vinylguaiacol, ktorý následne zdegradoval do 72. hodiny. 4-vinylguaiacol ale s veľkou pravdepodobnosťou nie je produktom biotransformácie FA, pretože bol detegovaný vo veľmi nízkych množstvách a po čase 0 hodín vo väčšine vykonaných experimentov degradoval.

Hlavným produktom biotransformácie FA bola kyselina vanilová. Od 24. hodiny bola kyselina vanilová zaznamenaná u všetkých kmeňoch. Koncentrácia kyseliny vanilovej sa v závislosti na čase významne nemenila u kmeňoch M 15344 a DSM 15264. U kmeňa LMG 21645 došlo k poklesu koncentrácie kyseliny vanilovej o cca 40 mg/l po 48. hodine. Najvyššia koncentrácia kyseliny vanilovej bola detegovaná u kmeňa LMG 21645 v 48. hodine (168 ± 7 mg/l). Priemerná biokonverzia kyseliny ferulovej na kyselinu vanilovú dosiahla hodnotu 58 %. Bakteriálny kmeň LMG 21645 utilizoval FA najefektívnejšie vzhľadom na to, že koncentrácia FA v čase 0 hodín bola z troch kmeňov najnižšia (242 ± 27 mg/l) a konverzia na VA bola u tohto kmeňa najvyššia.

4.1.2 Rastové krivky bakteriálnych kmeňov M 15344, DSM 15264 a LMG 21645



Obrázok 19: Rastové krivky bakteriálnych kmeňov M 15344, DSM 15264 a LMG 21645 v prítomnosti kyseliny ferulovej o koncentrácii 300 mg/l

Po zmeraní optickej hustoty vzoriek bola zostrojená rastová krivka kmeňov M 15344, DSM 15264 a LMG 21645.

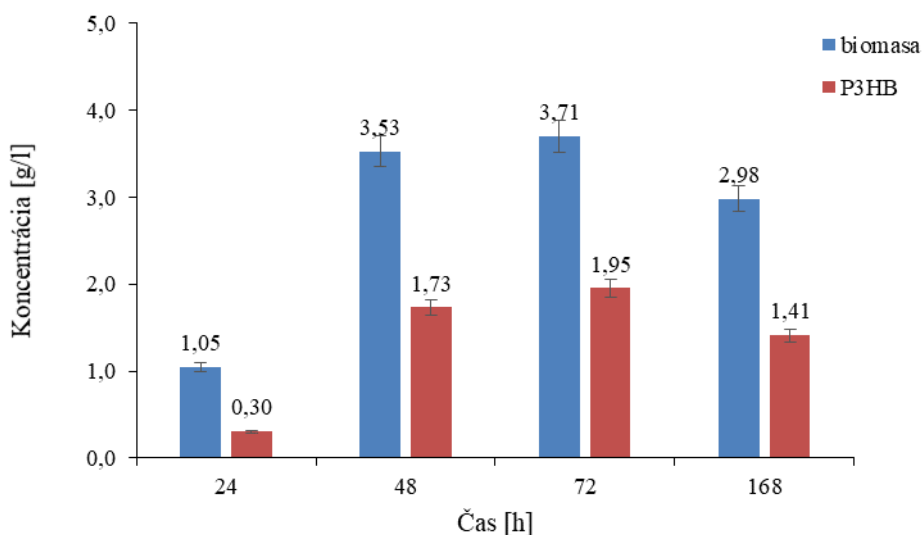
Schlegelella thermodepolymerans M 15344 v priebehu 24 hodín preukázala zrýchlený rast a následne od 24. hodiny do 48. hodiny bola v exponenciálnej fáze rastu. Ďalej nasledovala krátka stacionárna fáza v okolí 48. hodiny a konečná fáza odumierania do 168 hodín, kedy došlo k úplnému úhynu kultúry vzhľadom na OD namerané v čase 0 hodín.

Bakteriálny kmeň DSM 15264 mal podobnú rastovú krivku s kmeňom M 15344 s tým, že ku krátkej stacionárnej fáze došlo približne až v 60. hodine. Ďalej nasledovala fáza odumierania do 168 hodín.

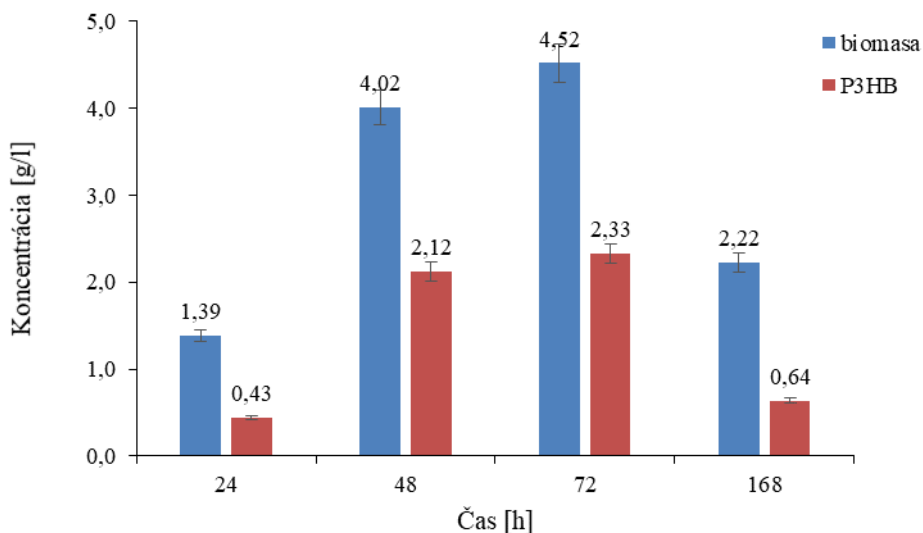
Bakteriálny kmeň LMG 21645 mal na rozdiel od kmeňov M 15344 a DSM 15264 odlišný priebeh rastovej krivky. V intervale 0 až 24 hodín pretrvávala lag fáza a následne medzi 24. až 72. hodinou došlo k zrýchlenému rastu. Od 72. hodiny potom prebiehala exponenciálna fáza až do 168 hodín. *Schlegelella thermodepolymerans* LMG 21645 teda preukázala predovšetkým neobvykle dlhú lag fázu a celkovo dlhý rast.

4.1.3 Vyprodukovaná biomasa a P3HB bakteriálnymi kmeňmi M 15344, DSM 15264 a LMG 21645 v prítomnosti FA

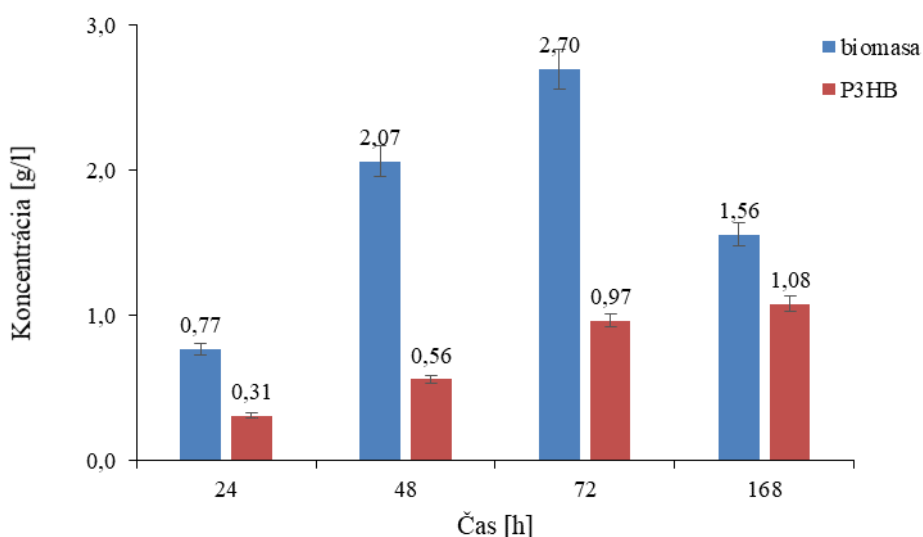
Nasledujúce grafy zobrazujú časový vývoj produkcie biomasy a P3HB tromi kmeňmi *S. thermodepolymerans* pri kyseline ferulovej o koncentrácii 0,3 g/l.



Obrázok 20: Vyprodukované množstvo biomasy a P3HB kmeňom M 15344 pri kyseline ferulovej o koncentrácii 0,3 g/l



Obrázok 21: Vyprodukované množstvo biomasy a P3HB kmeňom DSM 15264 pri kyseline ferulovej o koncentrácii 0,3 g/l



Obrázok 22: Vyprodukované množstvo biomasy a P3HB kmeňom LMG 21645 pri kyseline ferulovej o koncentrácii 0,3 g/l

Okrem biotransformácie FA bola v produkčných médiach obsahujúce FA pozorovaná produkcia biomasy a P3HB. Koncentrácia biomasy a P3HB bola zaznamenaná od 24. hodiny a maximum koncentrácie biomasy a P3HB pre všetky bakteriálne kmene okrem LMG 21645 (maximum P3HB bolo v 168. hodine) bolo dosiahnuté v 72. hodine. Najvyššia koncentrácia biomasy a P3HB bola u kmeňa DSM 15264: biomasa o koncentrácii $4,52 \pm 0,4$ g/l a P3HB o koncentrácii $2,23 \pm 0,2$ g/l. Množstvo biomasy a P3HB sa zhoduje aj s rastovými krivkami kmeňov M 15344 a DSM 15264 kedy stacionárna fáza bola dovŕšená v 48. resp. 72. hodine. Rastová krivka kmeňa LMG 21645 sa už úplne nezhoduje s vývojom koncentrácie biomasy pretože exponenciálna fáza pretrvávala až do 168 hodiny pričom biomasa už v tejto hodine klesla. Pri meraní OD kmeňa LMG 21645 mohlo dôjsť k chybe. Dosiahnutými výsledkami teda

bolo potvrdené, že vybrané bakteriálne kmene sú pri využití nižšej koncentrácie FA schopné nie len biotransformácie na VA ale aj produkcie P3HB.

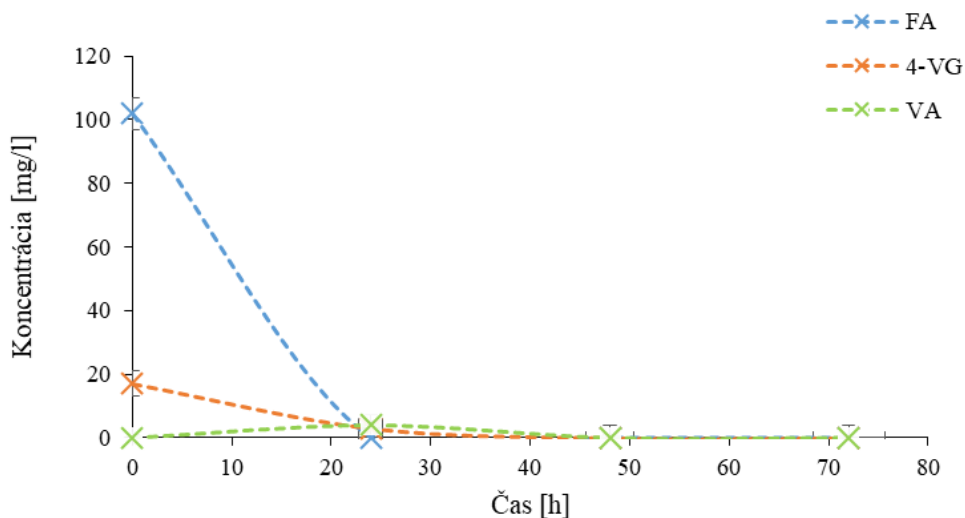
4.2 Kultivačné experimenty baktérie *Schlegelella thermodepolymerans* M15344 s rôznymi koncentraciami kyseliny ferulovej

Druhým experimentom bola kultivácia kmeňa baktérie *Schlegelella thermodepolymerans* M 15344 s rôznymi počiatočnými koncentraciami kyseliny ferulovej, t.j.: 100 mg/l, 300 mg/l, 500 mg/l a 700 mg/l. Každá koncentrácia kyseliny ferulovej mala dve repetície a meranie na HPLC prebehlo pre každú vzorku dvakrát.

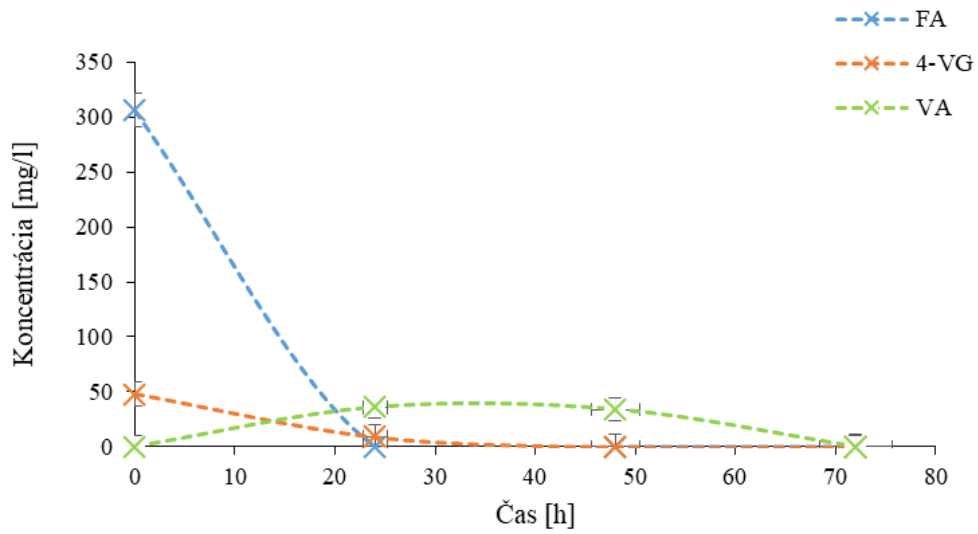
Na kultiváciu bolo použité živné médium z LB o koncentrácii 20 g/l v destilovanej vode a minerálne médium. Odbery supernatantu a biomasy prebehli v čase 0, 24, 48 a 72 hodín pričom bolo zmerané pH a optická hustota. Po kultiváciach bol supernatant použitý na analýzu na HPLC a vysušený pelet biomasy na GC-FID.

4.2.1 Priebeh biotransformácie FA kmeňom M 15344 pri rôznych počiatočných koncentraciach FA

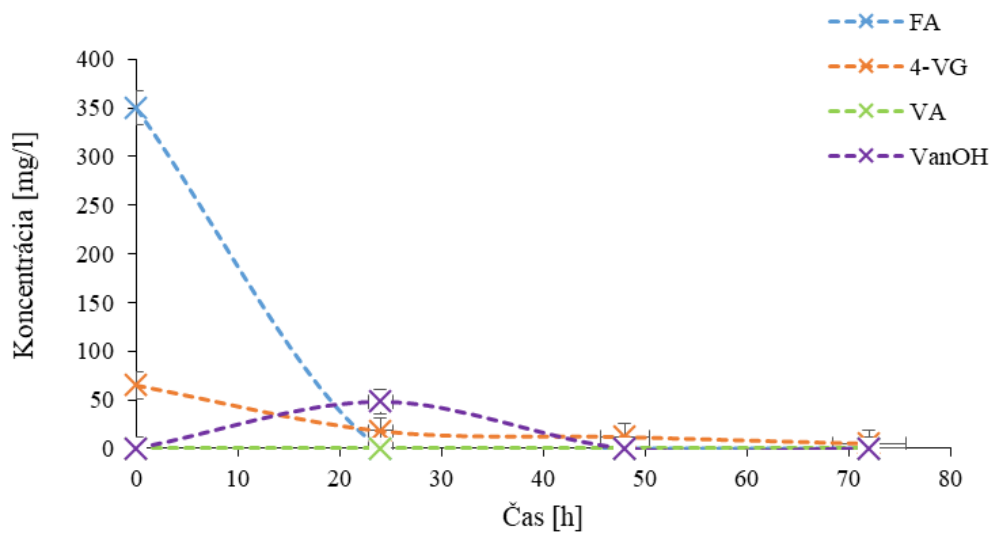
Nasledujúce grafy zobrazujú časový vývoj úbytku kyseliny ferulovej a tvorbu jednotlivých metabolitov pri rôznych počiatočných koncentraciach kyseliny ferulovej pre bakteriálny kmeň M 15344.



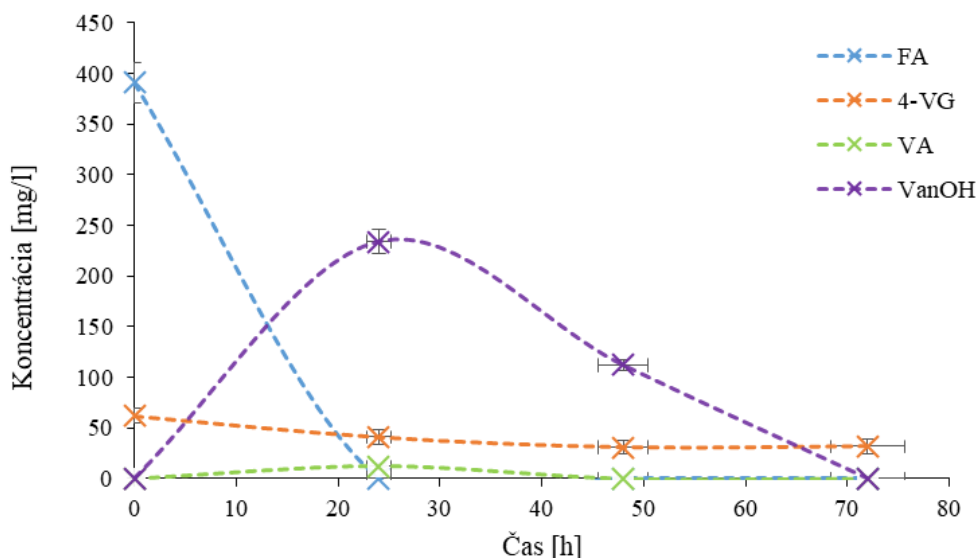
Obrázok 23: Zaznamená koncentrácia fenolových látok po biotransformácii kyseliny ferulovej o koncentrácii 100 mg/l kmeňom M 15344



Obrázok 24: Zaznamená koncentrácia fenolových látok po biotransformácii kyseliny ferulovej o koncentrácii 300 mg/l kmeňom M 15344



Obrázok 25: Zaznamená koncentrácia fenolových látok po biotransformácii kyseliny ferulovej o koncentrácii 500 mg/l kmeňom M 15344



Obrázok 26: Zaznamená koncentrácia fenolových látok po biotransformácii kyseliny ferulovej o koncentrácii 700 mg/l kmeňom M 15344

Tabuľka 3: Priemerná biokonverzia fenolových látok rôznych koncentrácií kyseliny ferulovej

Koncentrácia	Priemerná biokonverzia VA	Priemerná biokonverzia VanOH
100 mg/l	4 %	N.D.
300 mg/l	13 %	N.D.
500 mg/l	N.D.	17 %
700 mg/l	3 %	56 %

Z pôvodných navážených koncentrácií kyseliny ferulovej 500 mg/l a 700 mg/l bolo v čase 0 hodín zaznamenaných len 350 ± 10 mg/l a 391 ± 12 mg/l. Dôvodov výrazne nižšej koncentrácie FA v čase 0 hodín môže byť viacero. Prvým dôvodom môže byť oneskorený prvý odber po zaočkovaní produkčného média o približne 20 minút, vzhľadom na to, že baktéria *S. thermodepolymerans* veľmi rýchlo utilizuje FA. K poklesu koncentrácie FA ďalej mohlo dôjsť dekarboxyláciou FA na 4-VG pri sterilizácii, čo bolo potvrdené vo viacerých odborných prácach [60, 61]. Ďalšou príčinou zníženia koncentrácie FA v čase 0 hodín môže byť to, že sa neuvažovalo o prídavku stopových prvkov, xylózy a inokola. Tieto komponenty navýšili objem produkčného média a mohli spôsobiť odchýlku v nameranej koncentrácii FA. Poslednou príčinou nízkej koncentrácie FA v čase 0 hodín by mohlo byť ešte nepresné naváženie FA na analytických váhach a predvážkach (FA bola zvážená častejšie na predvážkach) a s tým spojené nekvantitatívne prevedenie FA z navážky do Erlenmeyerovej banky. V prípade FA o pôvodnej koncentrácii 700 mg/l, ktorá bola v čase 0 hodín zaznamenaná na koncentrácii 391 ± 12 mg/l, však tieto dôvody nepokryjú veľkú odchýlku, ktorá tu presahuje až 40 %. Túto chybu sa už nepodarilo ďalej odôvodniť. K výraznej odchýlke dochádzalo v každom experimente najmä v prípade koncentrácie 500 mg/l a viac.

Kyselina ferulová bola kompletne metabolizovaná do 24 hodín pri všetkých koncentráciách. Vyššie koncentrácie FA (500 mg/l a 700 mg/l) nespôsobili predĺženie kompletnej degradácie

FA. Baktéria *S. thermodepolymerans* M 15344 teda spotrebovala celkovú FA do 24 hodín aj v prípade vyšších koncentrácií ako 500 mg/l a 700 mg/l.

4-vinylguaiacol bol detegovaný vo všetkých vzorkách v nízkych koncentráciách, ktorý postupne degradoval. Dôvodom jeho vzniku boli pravdepodobne spomínané dekarboxylačné reakcie pri sterilizácii produkčného média s FA. Najvyššia koncentrácia 4-VG bola detegovaná pri FA o počiatočnej koncentrácii 700 mg/l. 4-VG pri FA o vyššej koncentrácii nedegradoval tak výrazne ako v prípade nižších koncentrácií FA.

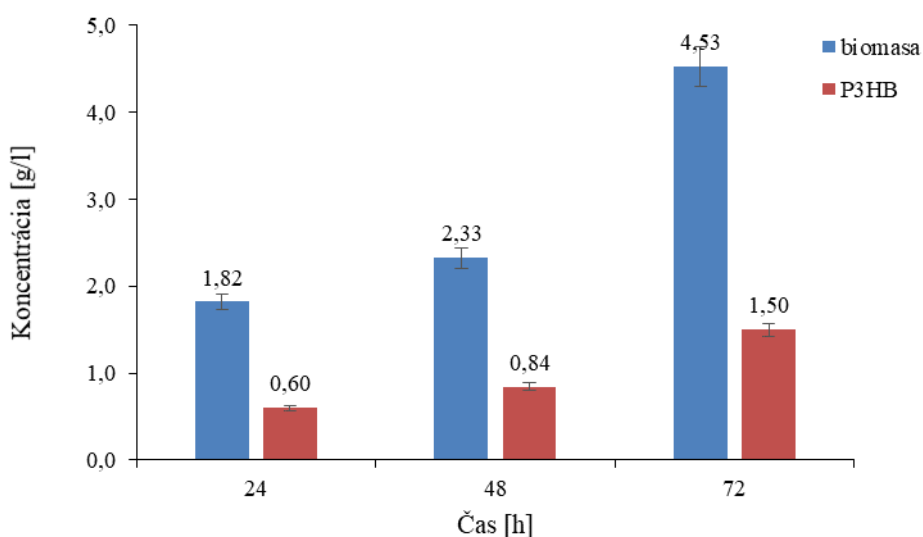
Kyselina vanilová bola detegovaná v stopových množstvách vo všetkých vzorkách okrem vzorky s kyselinou ferulovou o koncentrácii 500 mg/l. Najvyššia hodnota (36 ± 2 mg/l) bola dosiahnutá vo vzorke s kyselinou ferulovou o koncentrácii 300 mg/l v 24. hodine s priemernou hodnotou biokonverzie 13 %. Bakteriálny kmeň M 15344 teda vyprodukoval optimálne množstvo VA pri FA o počiatočnej koncentrácii 300 mg/l.

Vanilylalkohol bol detegovaný od vzorky s kyselinou ferulovou o koncentrácii 500 mg/l s maximom (234 ± 22 mg/l) pri koncentrácii 700 mg/l v 24. hodine a priemernou hodnotou biokonverzie 56 %. Na produkciu vanilylalkoholu kmeňom M 15344 boli teda vhodnejšie vyššie koncentrácie FA.

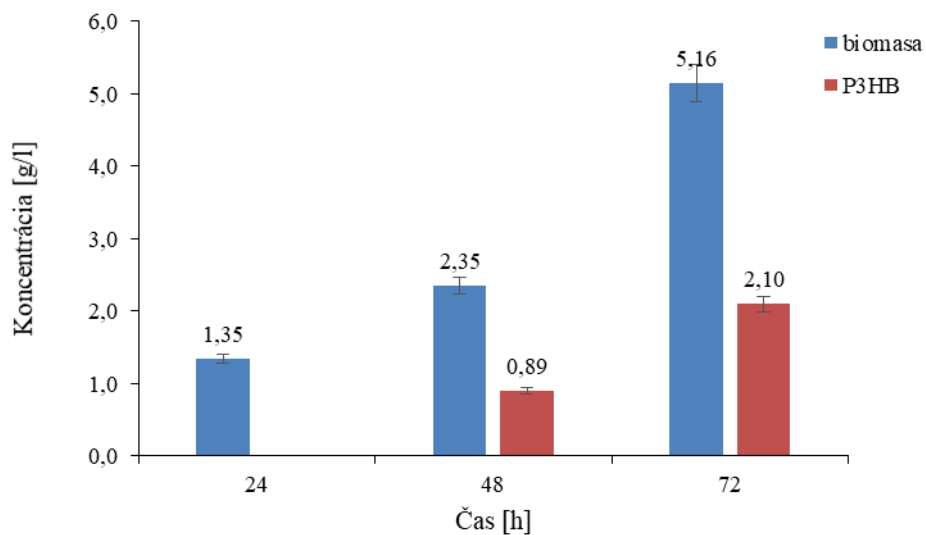
Na základe týchto výsledkov by teda bolo možné sa biotechnologicky zamerať na ciele biotransformácie FA na kyselinu vanilovú pri použití FA o nižších koncentráciách (100 mg/l a 300 mg/l). Na cieľnú produkciu vanilylalkoholu by sa na druhú stranu aplikovali vyššie koncentrácie FA (500 mg/l a 700 mg/l), kedy konverzia na VA je už potlačovaná.

4.2.2 Vyprodukovaná biomasa a P3HB kmeňom M 15344 pri rôznych počiatočných koncentráciách FA

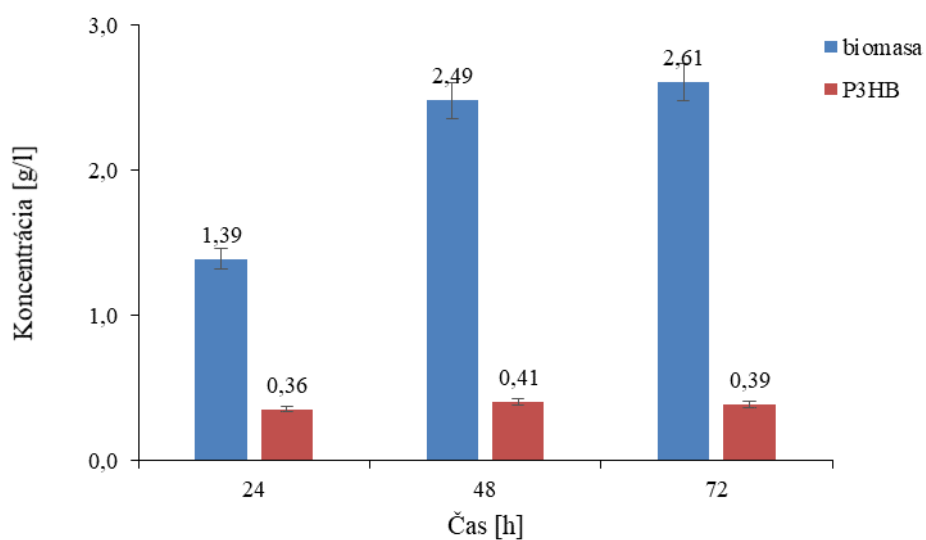
Nasledujúce grafy zobrazujú časový vývoj produkcie biomasy a P3HB bakteriálnym kmeňom M 15344 pri kyseline ferulovej o rôznych počiatočných koncentráciách.



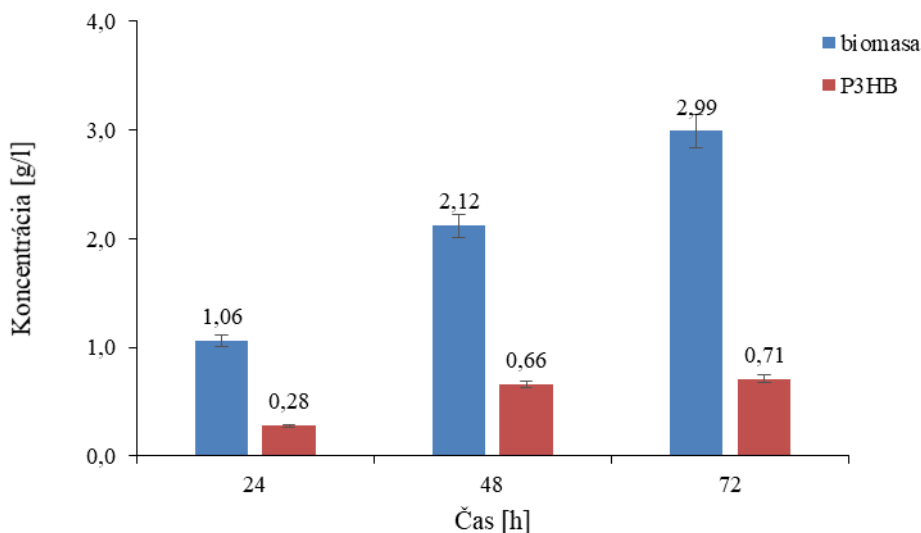
Obrázok 27: Vyprodukované množstvo biomasy a P3HB kmeňom M 15344 s kyselinou ferulovou o koncentrácii 0,1 g/l



Obrázok 28: Vyprodukované množstvo biomasy a P3HB kmeňom M 15344 s kyselinou ferulovou o koncentrácii 0,3 g/l



Obrázok 29: Vyprodukované množstvo biomasy a P3HB kmeňom M 15344 s kyselinou ferulovou o koncentrácii 0,5 g/l



Obrázok 30: Vyprodukované množstvo biomasy a P3HB kmeňom M 15344 s kyselinou ferulovou o koncentrácii 0,7 g/l

Maximum koncentrácie biomasy a P3HB pre všetky koncentrácie kyseliny ferulovej bolo dosiahnuté v 72. hodine. Najvyššia koncentrácia biomasy ($5,16 \pm 0,2$ g/l) a P3HB ($2,10 \pm 0,1$ g/l) bola vo vzorke, ktorá obsahovala kyselinu ferulovú o koncentrácii 0,3 g/l. Kyselina ferulová o koncentrácii 0,3 g/l sa javila ako najvhodnejšia koncentrácia na produkciu P3HB a biomasy pretože pri vyšších koncentráciách už bol pravdepodobne inhibovaný rast a produkčné schopnosti kultúry.

Kyselina ferulová o koncentrácii 0,3 g/l je teda optimálna nie len pre konverziu na VA ale aj na produkciu P3HB v prípade bakteriálneho kmeňa M 15344.

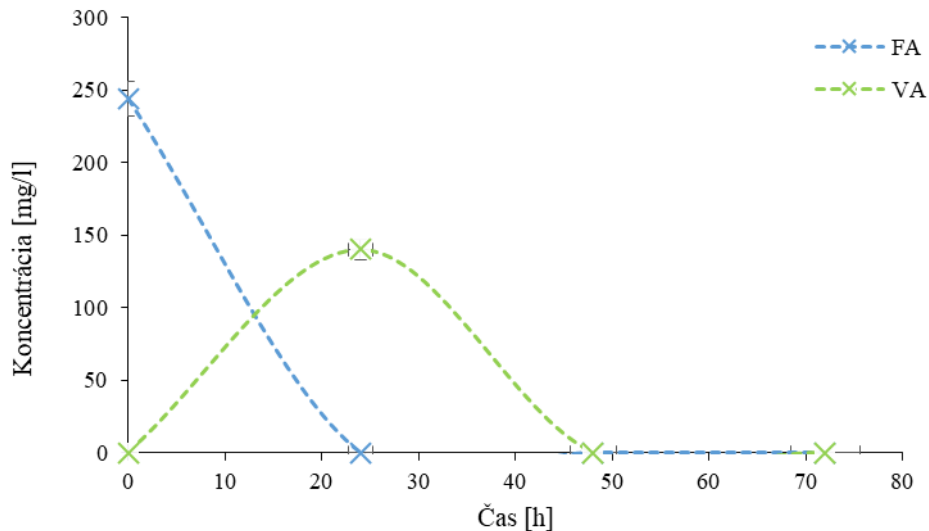
4.3 Kultivačné experimenty baktérie *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 s kyselinou ferulovou

Vzhľadom na to, že bakteriálny kmeň M 15344 (lyofilizovaný v českej zbierke) spôsobil netypické fialové sfarbenie produkčných médií viacerých študentov v laboratóriu (jednalo sa pravdepodobne o kontamináciu), tak boli zvyšné experimenty vykonané s modelovým kmeňom DSM 15344. Neštandardné chovanie bakteriálneho kmeňa M 15344 mohlo byť spôsobené opätovnou lyofilizáciou pôvodného kmeňa DSM 15344 z nemeckej zbierky mikroorganizmov. Nasledujúci experiment bol vykonaný s bakteriálnym kmeňom DSM 15344 s kyselinou ferulovou o koncentrácii 300 mg/l. Meranie prebiehalo s dvoma repetíciami.

Na živné médium bol použitý Nutrient broth o koncentrácii 25 g/l v destilovanej vode a minerálne médium. Odbery supernatantu a biomasy prebehli v čase 0, 24, 48 a 72 hodín pričom bolo zmerané pH a optická hustota. Po kultiváciách bol supernatant použitý na analýzu na HPLC a vysušený pelet biomasy na GC-FID.

4.3.1 Priebeh biotransformácie kyseliny ferulovej kmeňom DSM 15344

Nasledujúci graf zobrazuje časový vývoj úbytku kyseliny ferulovej a tvorbu jednotlivých metabolitov pri kyseline ferulovej o počiatočnej koncentrácii 300 mg/l pre bakteriálny kmeň M 15344.



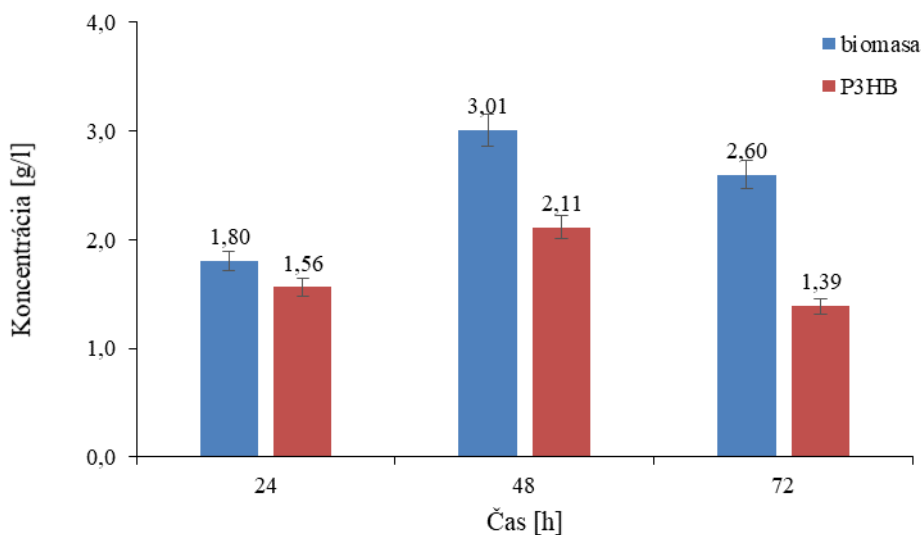
Obrázok 31: Zaznamená koncentrácia fenolových látok po biotransformácii kyseliny ferulovej o koncentrácii 300 mg/l kmeňa DSM 15344

Bakteriálny kmeň DSM 15344, taktiež ako predošlé kmene *S. thermodepolymerans*, rýchlo spotreboval kompletnú kyselinu ferulovú o počiatočnej koncentrácii 300 mg/l do 24 hodín. Došlo ku 66% konverzii na kyselinu vanilovú v 24. hodine, ktorá do 48 hodín zdegradovala. Biotransformáciou kyseliny ferulovej o nižšej koncentrácii kmeňom DSM 15344 teda dochádza vyhradene ku konverzii na kyselinu vanilovú. V tomto experimente s kmeňom DSM 15344 nebol detegovaný žiaden 4-VG.

V porovnaní s bakteriálnym kmeňom M 15344 (lyofilizovaný v českej zbierke) vykazuje kmeň DSM 15344 (nemecká zbierka) lepšiu schopnosť biokonverzie FA na VA. Kmeň M 15344 dosiahol 25% priemernú konverziu pričom kmeň DSM 15344 dosiahol až 66% konverziu FA na VA. *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 sa teda zdá byť vhodnejším kandidátom na produkciu VA pri nižších počiatočných koncentráciách FA ako bakteriálny kmeň M 15344.

4.3.2 Vyprodukovaná biomasa a P3HB kmeňom DSM 15344 v prítomnosti FA

Nasledujúci graf zobrazuje časový vývoj produkcie biomasy a P3HB bakteriálnym kmeňom DSM 15344 pri kyseline ferulovej o počiatočnej koncentrácii 0,3 g/l.



Obrázok 32: Vyprodukované množstvo biomasy a P3HB kmeňom DSM 15344 pri FA o koncentrácii 0,3 g/l

Okrem vznikajúcich látok s pridanou hodnotou procesom biotransformácie došlo kmeňom DSM 15344 aj k produkcii biomasy a P3HB. Najväčšie množstvo biomasy a P3HB bolo dosiahnuté v 48. hodine: $3,01 \pm 0,2$ g/l biomasy a $2,11 \pm 0,1$ g/l P3HB. Modelový kmeň DSM 15344 teda preukazuje ako optimálny čas na produkciu P3HB a biomasy 48 hodín v porovnaní s predošlými bakteriálnymi kmeňmi M 15344, DSM 15264 a LMG 21645, ktoré dosiahli maximum biomasy a P3HB v čase 72 hodín.

Kyselina ferulová o koncentrácii 0,3 g/l je teda vhodná pre konverziu na VA a na produkciu P3HB aj v prípade bakteriálneho kmeňa DSM 15344.

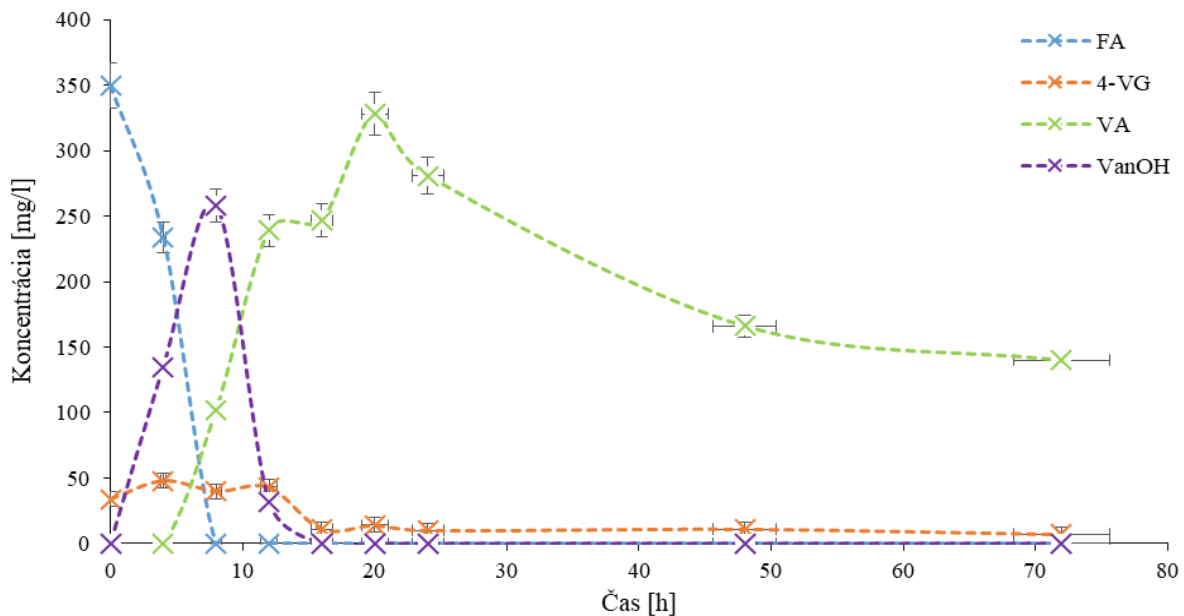
4.4 Kultivačné experimenty baktérie *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 s kyselinou ferulovou a abiotická kontrola kyseliny ferulovej

Ďalším experimentom bola kultivácia kmeňa *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 s kyselinou ferulovou o koncentrácii 500 mg/l a abiotická kontrola kyseliny ferulovej. Abiotická kontrola slúžila na overenie toho, že kyselina ferulová tepelne nedegraduje v neprítomnosti baktérii pôsobením vyššej kultivačnej teploty. Meranie prebiehalo s dvoma repetíciami.

Na živné médium bol použitý Nutrient broth o koncentrácii 25 g/l v destilovanej vode a minerálne médium. Odbery tentokrát prebehli v čase 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48 a 72 hodín pričom bolo zmerané pH a optická hustota. Štvorhodinové odbery do 24 hodín prebehli z dôvodu zistenia doby za ktorú bola kyselina ferulová metabolizovaná vzhľadom na výsledky z predošlých experimentov, kde kyselina ferulová už nebola v 24. hodine detegovaná. Po kultiváciach bol supernatant použitý na analýzu na HPLC a vysušený pelet na GC-FID.

4.4.1 Priebeh biotransformácie kyseliny ferulovej kmeňom DSM 15344

Nasledujúci graf zobrazuje časový vývoj úbytku kyseliny ferulovej a tvorbu jednotlivých metabolitov v užších časových intervaloch pri kyseline ferulovej o počiatočnej koncentrácii 500 mg/l kmeňom DSM 15344.



Obrázok 33: Zaznamená koncentrácia produktov u kmeňu DSM 15344 po biotransformácii kyseliny ferulovej o koncentrácii 500 mg/l

Navážená koncentrácia kyseliny ferulovej bola 540 ± 38 mg/l avšak koncentrácia v čase 0 hodín bola zaznamenaná na 350 ± 18 mg/l. Toto mohlo byť znova spôsobené spomínanými možnými príčinami v kapitole 4.2.1: neskorší čas odberu, dekarboxylácia FA na 4-VG pri sterilizácii, prídavok komponent do produkčného média, nepresné naváženie a prevedenie FA do banky. Kyselina ferulová bola kompletne metabolizovaná do 8 hodín od kultivácie. Týmto experimentom bola upresnená doba za ktorú bola FA kompletne spotrebovaná kmeňom DSM 15344.

4-VG už pri FA o koncentrácii 500 mg/l a kmeni DSM 15344 bol detegovaný v nízkych množstvách na rozdiel od predošlého experimentu s FA o koncentrácii 300 mg/l. 4-VG tu znova pravdepodobne vznikol pri sterilizácii produkčného média s FA, nie je teda produktom biotransformácie FA.

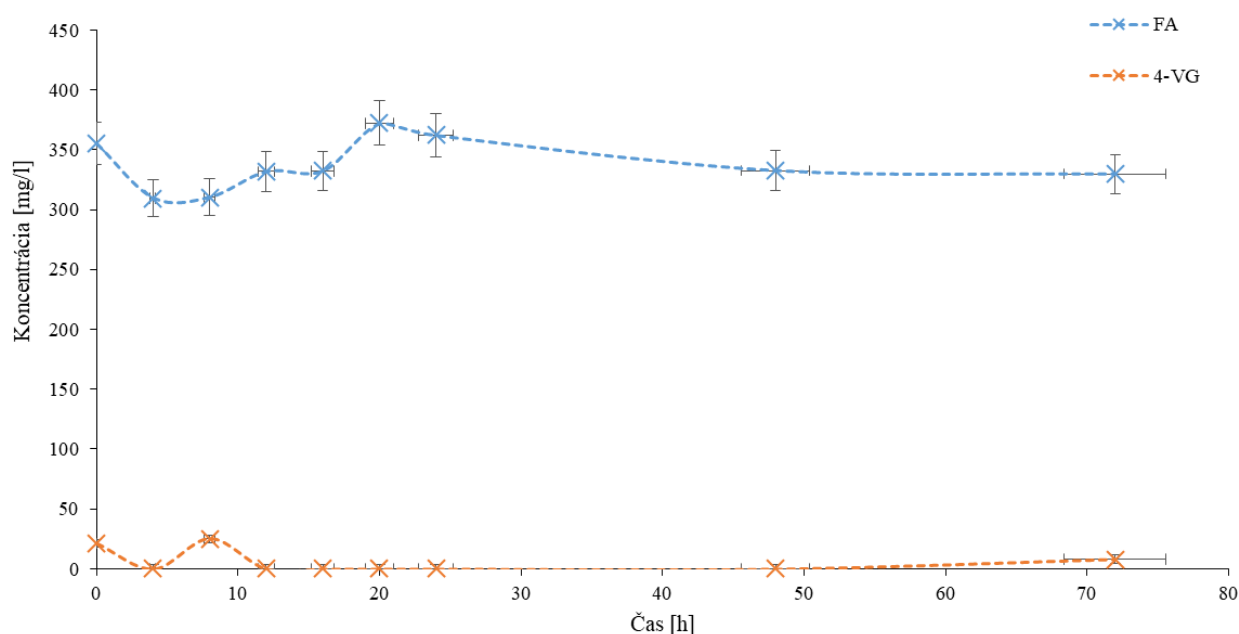
Kyselina vanilová bola detegovaná od 8. hodiny pričom najvyššia koncentrácia (328 ± 27 mg/l) bola dosiahnutá v 20. hodine, jednalo sa až o 108% konverziu. Vysoká miera konverzie je spôsobená tým, že bol zásadný rozdiel v pôvodnej naváženej koncentrácii FA a nameranej koncentrácii FA v čase 0 hodín (540 ± 38 mg/l \rightarrow 350 ± 18 mg/l).

Vanilylalkohol bol detegovaný od 4. hodiny a najvyššia koncentrácia (258 ± 15 mg/l) bola v 8. hodine, jednalo sa o 93% konverziu. Vysoká miera konverzie bola taktiež spôsobená veľkou odchýlkou v naváženej koncentrácii FA a koncentrácii FA v čase 0 hodín.

Týmto experimentom sa dokázalo, že *S. thermodepolymerans* DSM 15344 veľmi rýchlo utilizuje kyselinu ferulovú s kompletnou spotrebou FA o koncentrácii 500 mg/l do 8 hodín a produkuje vysoké výťažky najmä kyseliny vanilovej. Z Obrázku 33 je zrejmé, že vanilylalkohol sa hromadil do 8. hodiny a následne bola metabolická dráha presmerovaná výhradne na kyselinu vanilovú, ktorej koncentrácia sa naďalej zvyšovala až do 24. hodiny. Jednou možnosťou metabolickej cesty by mohla byť aj premena VanOH na VA, kedy koncentrácia VanOH sa od 8. hodiny znižovala, zatiaľ čo koncentrácia VA sa v tomto čase naďalej zvyšovala.

4.4.2 Abiotická kontrola kyseliny ferulovej

Nasledujúci graf zobrazuje časový vývoj koncentrácie kyseliny ferulovej v užších časových intervaloch pri kyseline ferulovej o počiatočnej koncentrácii 500 mg/l v neprítomnosti baktérii.



Obrázok 34: Abiotická kontrola kyseliny ferulovej o počiatočnej koncentrácii 500 mg/l

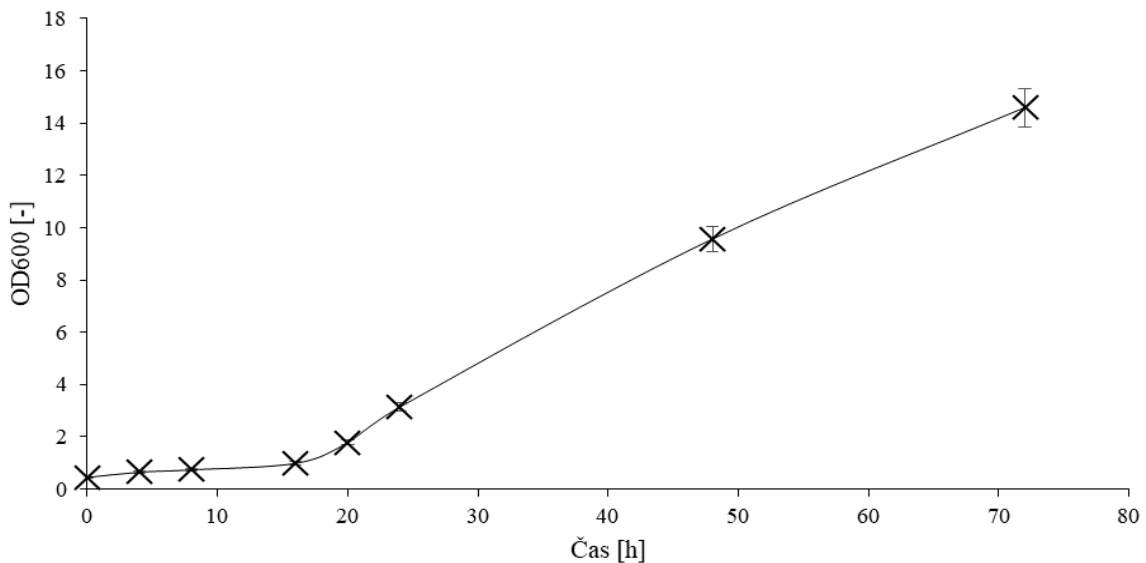
Abiotickou kontrolou bolo dokázané, že kyselina ferulová nebola tepelne degradovaná počas 50 °C teploty na trepačkách. Bola ale zaznamenaná koncentrácia 4-vinylguaiacolu, čo mohlo byť zapríčinené degradáciou kyseliny ferulovej počas sterilizácie minerálneho média.

Degradácia kyseliny ferulovej bola zaznamenaná napríklad v práci Fiddlera a kol., kde k degradácii došlo pri 245 °C. Dekarboxyláciou vznikol 4-vinylguaiacol a následnou oxidáciou vznikla kyselina vanilová [60].

K degradácii kyseliny ferulovej došlo aj v práci Arrieta-Baez, kde bola zaznamenaná 32 % degradácia po 20 minútach sterilizácie. Následne na HPLC bol zaznamenaný 4-vinylguaiacol [61].

V našom experimente trvala sterilizácia 30 minút a priemerná degradácia bola 35 % (pôvodných 540 ± 38 mg/l na 350 ± 22 mg/l) a taktiež bol zaznamenaný 4-vinylguaiacol.

4.4.3 Rastová krivka kmeňa DSM 15344

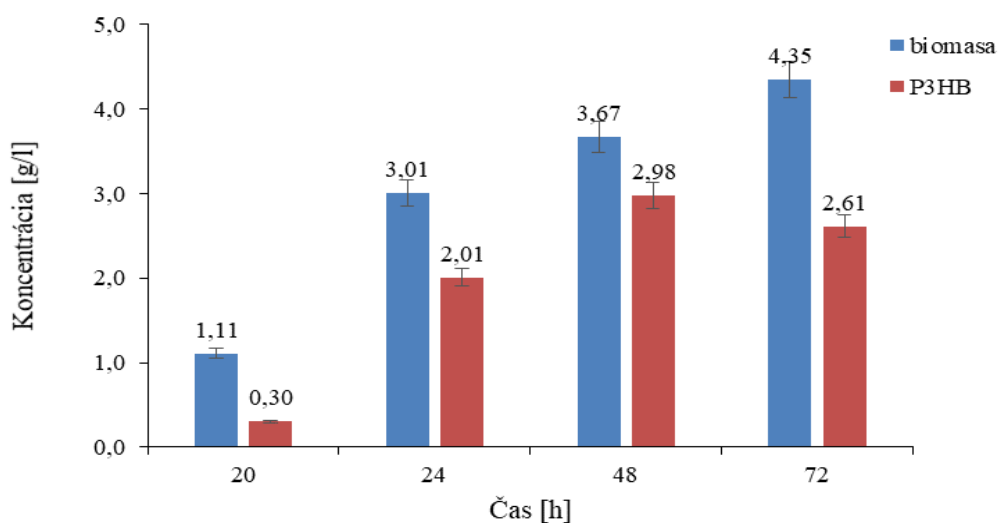


Obrázok 35: Rastová krivka kmeňa DSM 15344 s kyselinou ferulovou o koncentrácii 500 mg/l

Po zmeraní optickej hustoty vzoriek bola zostrojená rastová krivka baktérie *S. thermodepolymerans* DSM 15344. Rastová krivka naznačuje, že lag fáza pretrvávala 16 hodín a následne medzi 16. a 24. hodinovou došlo k zrýchlenému rastu kde od 24. hodiny nasledovala exponenciálna fáza do 72. hodiny. Exponenciálna fáza rastu kmeňa DSM 15344 z nemeckej zbierky mikroorganizmov je v porovnaní s kmeňom M 15344 dlhšia; kmeň M 15344 dosiahol stacionárnu fázu už v 48. hodine.

4.4.4 Vyprodukovaná biomasa a P3HB kmeňom DSM 15344 v prítomnosti FA

Nasledujúci graf zobrazuje časový vývoj produkcie biomasy a P3HB bakteriálnym kmeňom DSM 15344 pri kyseline ferulovej o počiatkovej koncentrácii 0,5 g/l.



Obrázok 36: Vyprodukované množstvo biomasy a P3HB kmeňom DSM 15344 pri FA o koncentrácii 0,5 g/l

Senzoricky aktívne látky vzniknuté procesom biotransformácie FA znova neboli jediným významným produktom kultivačných experimentov. K produkcii významných množstiev biomasy a P3HB dochádzalo od 20. hodiny. Najvyššia koncentrácia biomasy bola dosiahnutá v 72. hodine: $4,35 \pm 0,3$ g/l. Dosiahnuté výťažky biomasy sa zhodujú aj s rastovou krivkou kmeňa DSM 15344, kde v 72 hodinách naďalej pretrvávala exponenciálna fáza. Najvyššia koncentrácia P3HB pri FA o koncentrácii 0,5 g/l bola opäť dosiahnutá v 48. hodine: $2,98 \pm 0,2$ g/l.

Na základe získaných výťažkov fenolových látok a P3HB by sa dalo tvrdiť, že *S. thermodepolymerans* DSM 15344 najskôr utilizuje FA na produkcie látok s pridanou hodnotou a od 24. hodiny využíva xylózu na produkciu biomasy a P3HB s najväčšími výťažkami v čase 48 a 72 hodín.

4.5 Kultivačné experimenty baktérie *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 s rôznymi koncentraciami kyseliny ferulovej

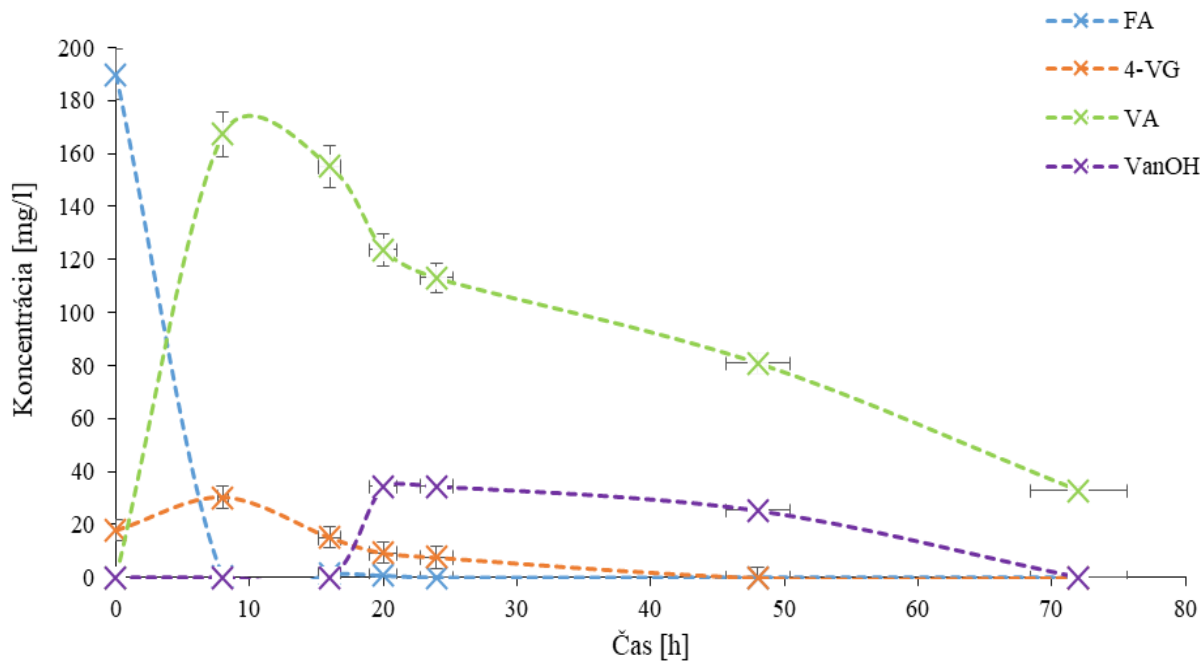
Posledný experiment zahŕňal prídanie kyseliny ferulovej do produkčného média pred a po sterilizácii, kde cieľom experimentu bolo zistenie efektu sterilizácie na kyselinu ferulovú. Experiment bol prevedený aj na základe toho, že bol pozorovaný rozdiel v produkcii fenolových látok medzi M 15344 a DSM 15344 s rôznymi počiatočnými koncentraciami FA. Bola použitá kyselina ferulová o koncentrácii 250 mg/l, 500 mg/l a 750 mg/l. Každá koncentrácia kyseliny ferulovej mala dve repetície, t.j. dve vzorky pre každú koncentráciu FA pred sterilizáciou produkčného média a dve vzorky pre každú koncentráciu FA po sterilizácii produkčného média.

Na živné médium bol použitý Nutrient broth o koncentrácii 25 g/l v destilovanej vode a ako produkčné médium bolo použité minerálne médium. Odbery supernatantu a biomasy prebehli v čase 0, 8, 16, 20, 24, 48 a 72 hodín pričom bolo zmerané pH a optická hustota. Po kultiváciach bol supernatant použitý na analýzu na HPLC a vysušený pelet biomasy na GC-FID.

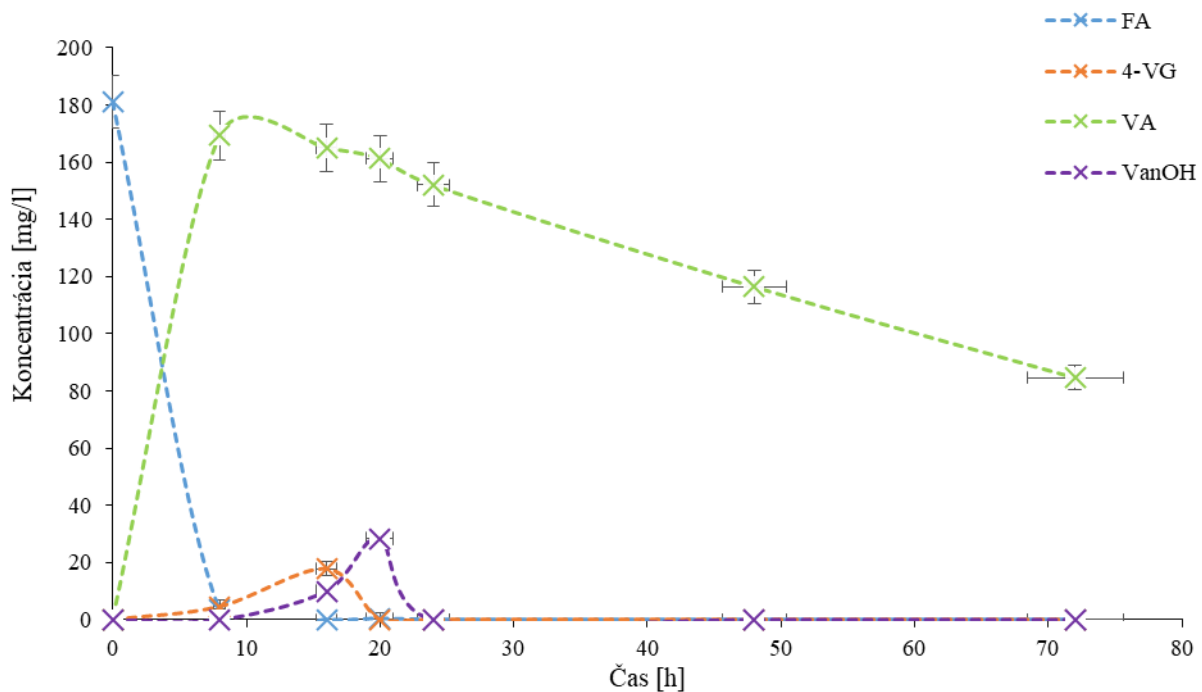
4.5.1 Priebeh biotransformácie kyseliny ferulovej kmeňom DSM 15344 pri rôznych počiatočných koncentraciách FA

Počiatočná navážená koncentrácia (250 mg/l, 500 mg/l a 750 mg/l) bola v čase 0 hodín znížená aj v prípade vzoriek ktoré obsahovali kyselinu ferulovú až po sterilizácii produkčného média. Koncentrácie kyseliny ferulovej v oboch prípadoch (pred a po sterilizácii) sú takmer rovnaké s minimálnou odchýlkou. V čase 0 hodín bola detegovaná FA o priemerných koncentraciách 185 ± 21 mg/l, 338 ± 35 mg/l, 408 ± 40 mg/l (Obrázky 37–42). Týmto meraním teda nebol dokázaný rozdiel v koncentrácii kyseliny ferulovej pred a po sterilizácii produkčného média.

Zásadný rozdiel bol v tom, že vzorky s kyselinou ferulovou pred sterilizáciou médií obsahovali v čase 0 hodín vyššiu koncentráciu 4-vinylguaiacolu ako v prípade FA po sterilizácii média, čo by naznačovalo následok degradácie kyseliny ferulovej sterilizáciou spomínanej v predošlej kapitole.



Obrázok 37: Vzorky obsahujúce kyselinu ferulovú o koncentrácii 250 mg/l pred sterilizáciou média



Obrázok 38: Vzorky obsahujúce kyselinu ferulovú o koncentrácii 250 mg/l po sterilizácii média

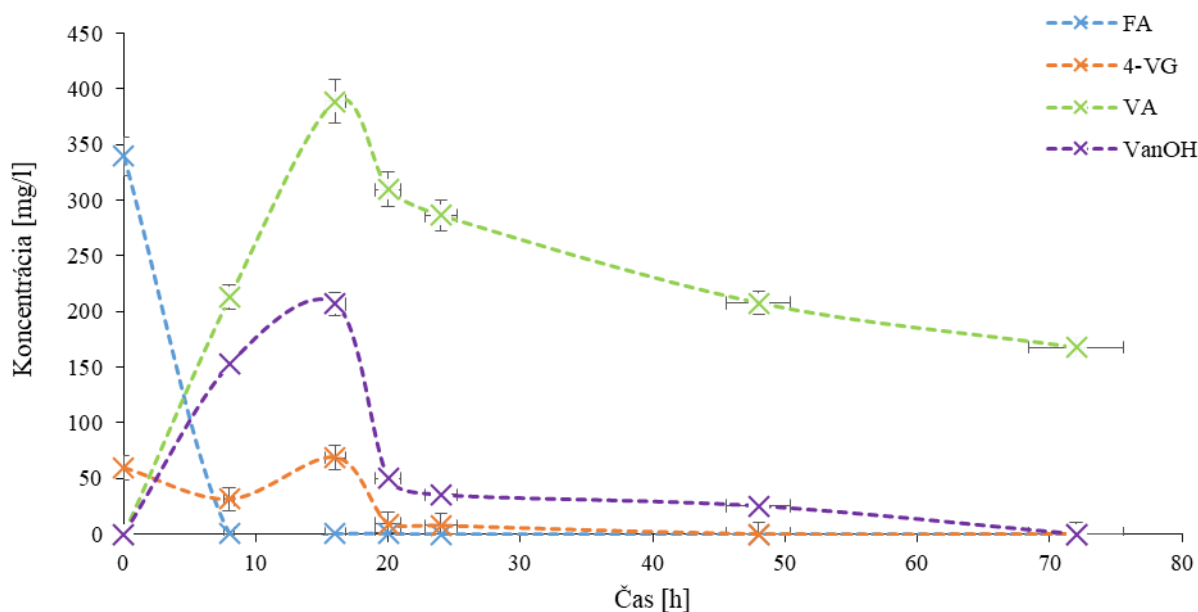
Kyselina ferulová o počiatočnej koncentrácii 250 mg/l bola v oboch prípadoch zmetabolizovaná kmeňom DSM 15344 do 8 hodín.

V prípade vzoriek s obsahom FA pred sterilizáciou média bola zaznamenaná vyššia koncentrácia 4-vinylguaiacolu v priebehu celej kultivácie oproti vzorkám s FA po sterilizácii. To je pravdepodobne spôsobené dekarboxylačnými reakciami počas sterilizácie.

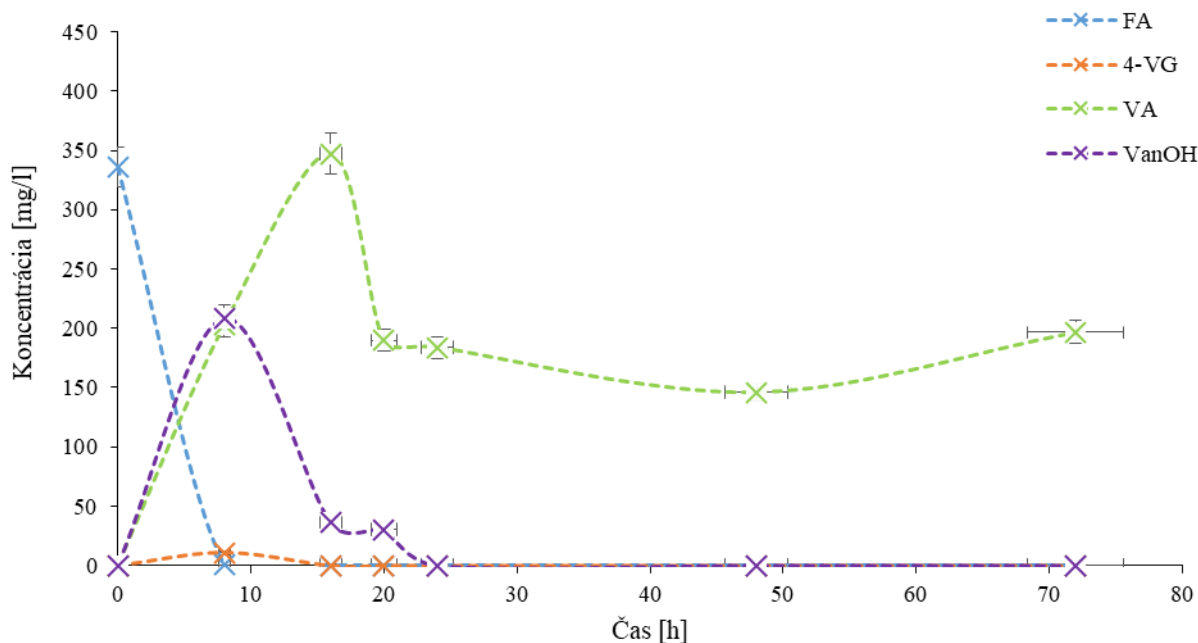
Vo vzorkách s FA pred aj po sterilizácii média bola zaznamenaná vysoká koncentrácia kyseliny vanilovej a to najmä v rozmedzí 8. až 16. hodiny. Najvyššia koncentrácia kyseliny vanilovej v oboch prípadoch bola dosiahnutá v 8. hodine o konverzii 102 %. Vysoká miera konverzie bola z časti spôsobená tým, že bol väčší rozdiel v pôvodnej naváženej koncentrácii FA a nameranej koncentrácii FA v čase 0 hodín ($254 \pm 38 \text{ mg/l} \rightarrow 185 \pm 21 \text{ mg/l}$).

Najvyššia konverzia vanilylalkoholu bola detegovaná v 20. hodine o hodnote 23 % vo vzorke s FA pred sterilizáciou média a konverzia 19 % v prípade FA po sterilizácii média. Po 20. hodine už ďalej dochádzalo k degradácii vanilylalkoholu.

Pri počiatočnej koncentrácii 250 mg/l FA teda výrazne prevažovala produkcia kyseliny vanilovej, čo naznačuje oxidačnú cestu biotransformácie kyseliny ferulovej. Na Obrázku 37 v prípade vzorky s FA pred sterilizáciou média je ešte možné pozorovať pokles VA v 16. hodine spojený s nárastom koncentrácie VanOH v 20. hodine naznačujúci ďalšiu možnosť opačnej konverzie VA na VanOH. Tento jav bol však pozorovaný jedine v tomto prípade s FA o koncentrácii 250 mg/l pred sterilizáciou.



Obrázok 39: Vzorky obsahujúce kyselinu ferulovú o koncentrácii 500 mg/l pred sterilizáciou média



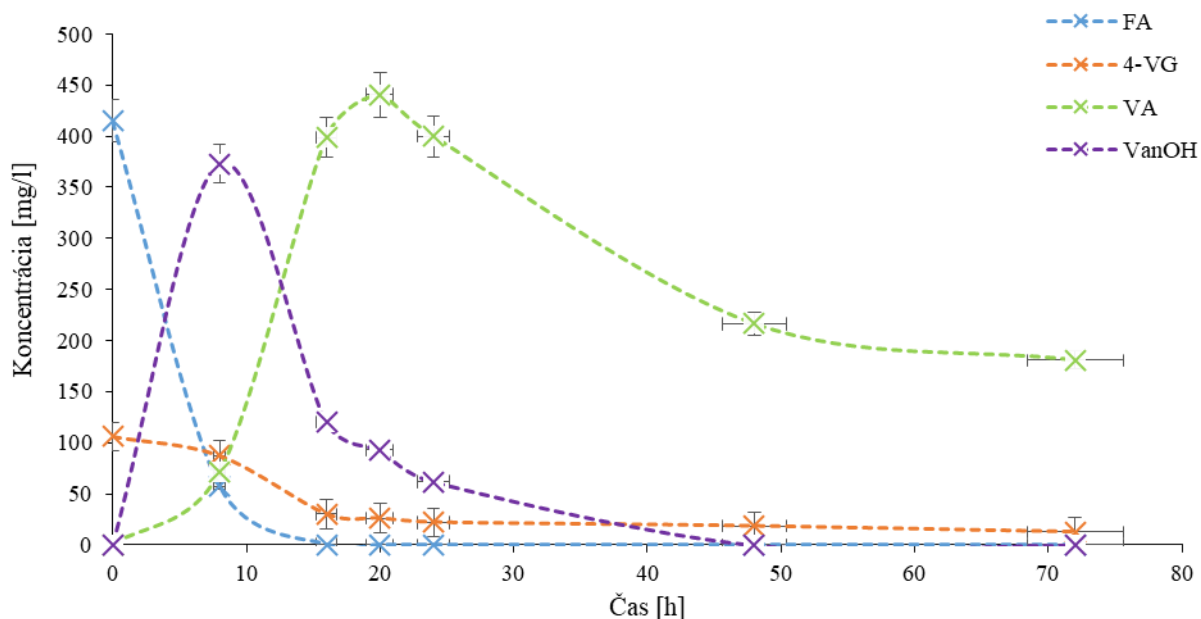
Obrázok 40: Vzorky obsahujúce kyselinu ferulovú o koncentrácii 500 mg/l po sterilizácii média

V prípade vzoriek s kyselinou ferulovou o koncentrácii 500 mg/l došlo taktiež k úplnej metabolizácii FA kmeňom DSM 15344 do 8 hodín.

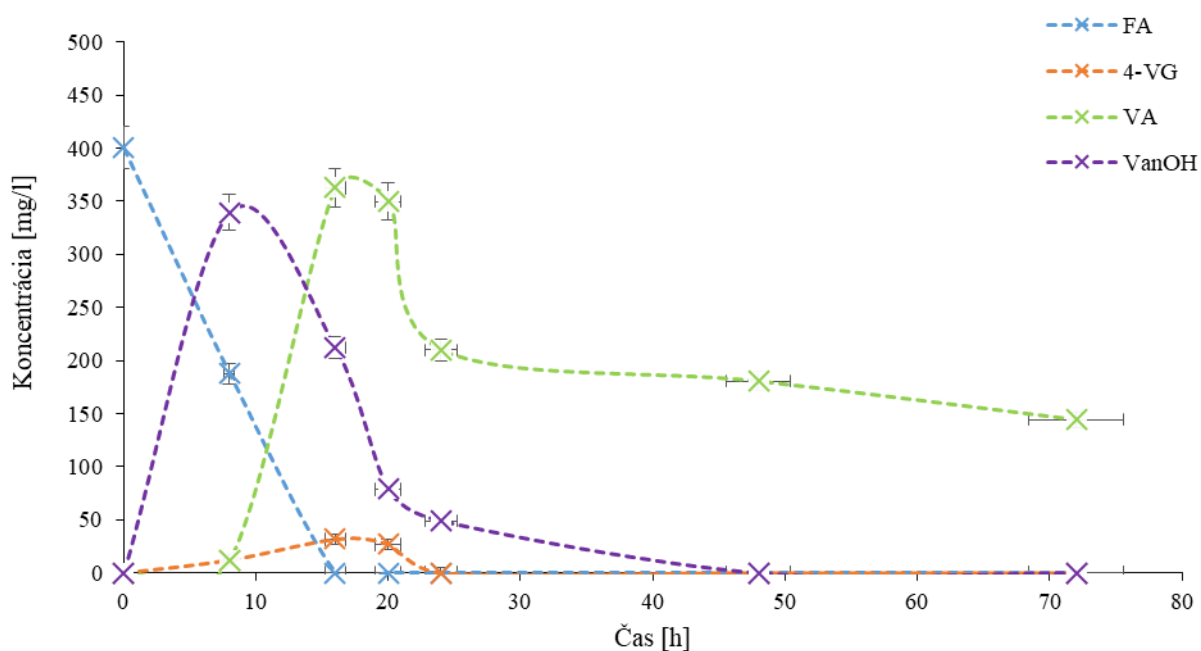
V prípade vzoriek s FA pred sterilizáciou média bola znova zaznamenaná vyššia koncentrácia 4-vinylguaiacolu oproti vzorkám s FA po sterilizácii, čo je znova pravdepodobne spôsobené dekarboxyláciou FA pri sterilizácii.

Kyselina vanilová v prítomnosti FA o koncentrácii 500 mg/l pred sterilizáciou dosiahla maximálnu koncentráciu v čase 16 hodín s konverziou až 132 %. V prípade FA po sterilizácii dosiahla VA v čase 16 hodín konverziu o hodnote 118 %. Vysoká miera konverzie bola opäť spôsobená tým, že bol väčší rozdiel v pôvodnej naváženej koncentrácii FA a nameranej koncentrácii FA v čase 0 hodín ($512 \pm 24 \text{ mg/l} \rightarrow 338 \pm 35 \text{ mg/l}$). Týmto sa znova potvrdilo, že použitie FA o koncentrácii 500 mg/l je najvhodnejšou voľbou na produkciu kyseliny vanilovej pomocou bakteriálneho kmeňa DSM 15344.

Vanilylalkohol pri použití FA o koncentrácii 500 mg/l bol detegovaný už vo vyššej miere oproti FA o koncentrácii 250 mg/l. Koncentrácia vanilylalkoholu sa ale už po 16. resp. 8. hodine rýchlo znižovala na úkor zvyšujúcej sa koncentrácie VA. Zvyšovaním koncentrácie FA sa teda pravdepodobne začína už viac aktivovať aj redukčná cesta metabolickej dráhy kyseliny ferulovej. Okrem možnej redukčnej dráhy tu podľa priebehu biotransformácie (Obrázok 39 a 40) pravdepodobne dochádza aj k prevedeniu VanOH na VA, kedy koncentrácia VanOH po 16. resp. 8. hodine prudko klesá a koncentrácia VA sa súbežne zvyšuje.



Obrázok 41: Vzorky obsahujúce kyselinu ferulovú o koncentrácii 750 mg/l pred sterilizáciou média



Obrázok 42: Vzorky obsahujúce kyselinu ferulovú o koncentrácii 750 mg/l po sterilizácii média

Pri vyššej koncentrácii FA o 750 mg/l bola metabolizácia kyseliny ferulovej kmeňom DSM 15344 predĺžená už na 16 hodín. Vyššia koncentrácia FA teda jasne spôsobila dlhšiu dobu úplnej spotreby FA kmeňom DSM 15344.

V prípade vzoriek s pridaním FA pred sterilizáciou média bola opäť zaznamenaná vyššia koncentrácia 4-vinylguaiajolu oproti vzorkám s FA po sterilizácii.

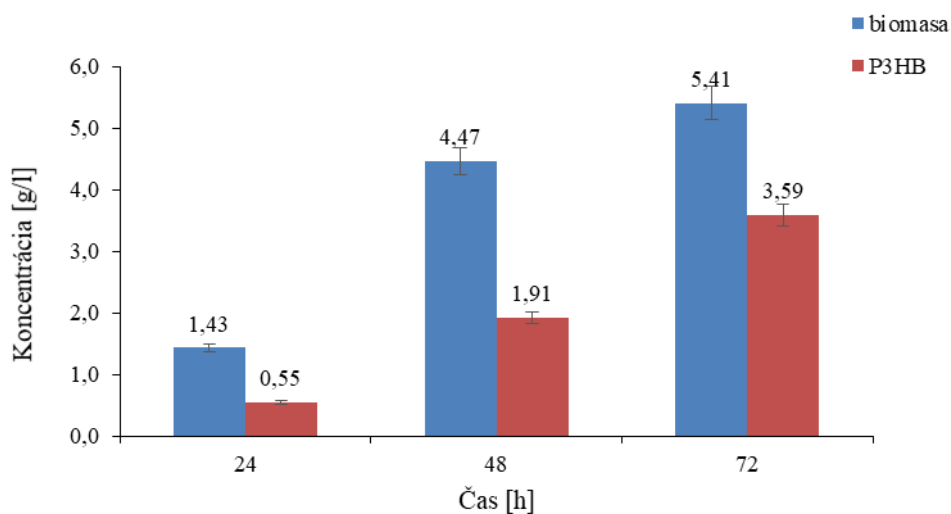
Kyselina vanilová pri FA pred sterilizáciou média dosiahla v 20. hodine 103% konverziu. V prípade vzoriek s FA po sterilizácii média bola dosiahnutá 101% konverzia na kyselinu vanilovú v 16. hodine. Vysoké miery konverzie boli opäť spôsobené tým, že bol príliš veľký rozdiel v pôvodnej naváženej koncentrácii FA a nameranej koncentrácii FA v čase 0 hodín ($758 \pm 26 \text{ mg/l} \rightarrow 408 \pm 40 \text{ mg/l}$).

Vo vzorke s obsahom FA pred sterilizáciou média bola v čase 8 hodín dosiahnutá 113% konverzia na vanilylalkohol. Vanilylalkohol ale opäť rýchlo degradoval až ku kompletnej degradácii v čase 48 hodín. V prípade FA po sterilizácii média bola v 8. hodine dovŕšená 103% konverzia na vanilylalkohol.

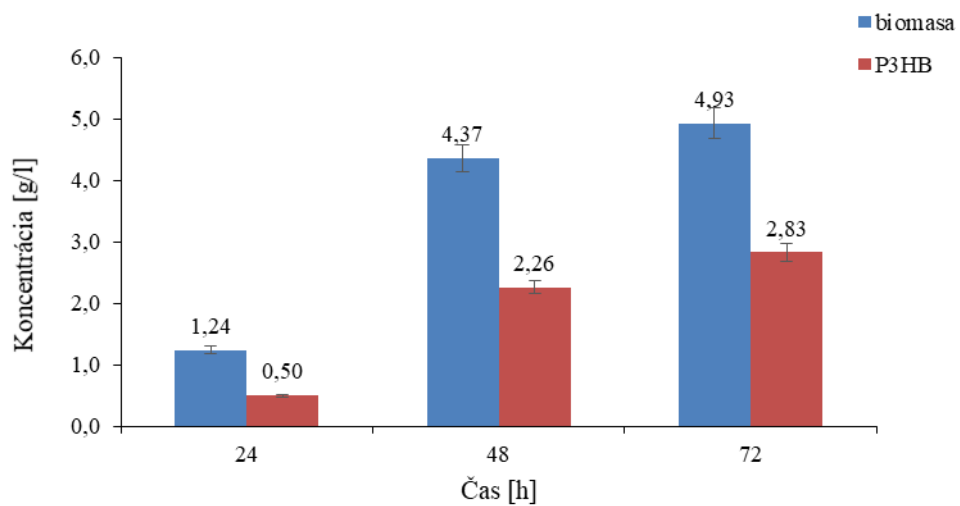
Na Obrázkoch 41 a 42 je vidno, že pri FA o počiatkovej koncentrácii 750 mg/l dominuje v čase 8 hodín konverzia na VanOH, a následne dochádza k premene na VA v 16. hodine. Týmto zaznamenanými koncentráciami sa teda ešte viac dá prikloniť k teórii o prevedení VanOH na VA od 8. hodiny kultivácie.

4.5.2 Vyprodukovaná biomasa a P3HB kmeňom DSM 15344 pri rôznych počiatkových koncentráciách FA

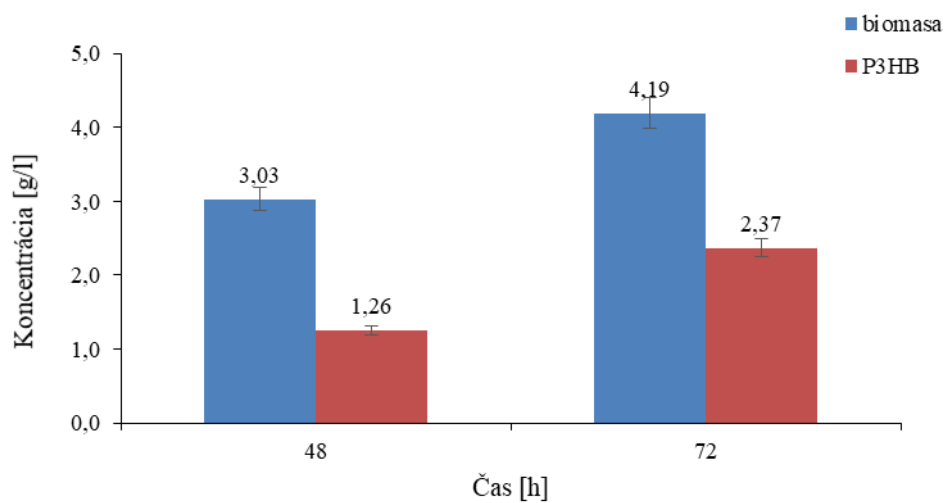
Nasledujúce grafy zobrazujú časový vývoj produkcie biomasy a P3HB bakteriálnym kmeňom DSM 15344 pri rôznych počiatkových koncentráciách kyseliny ferulovej pred a po sterilizácii produkčného média.



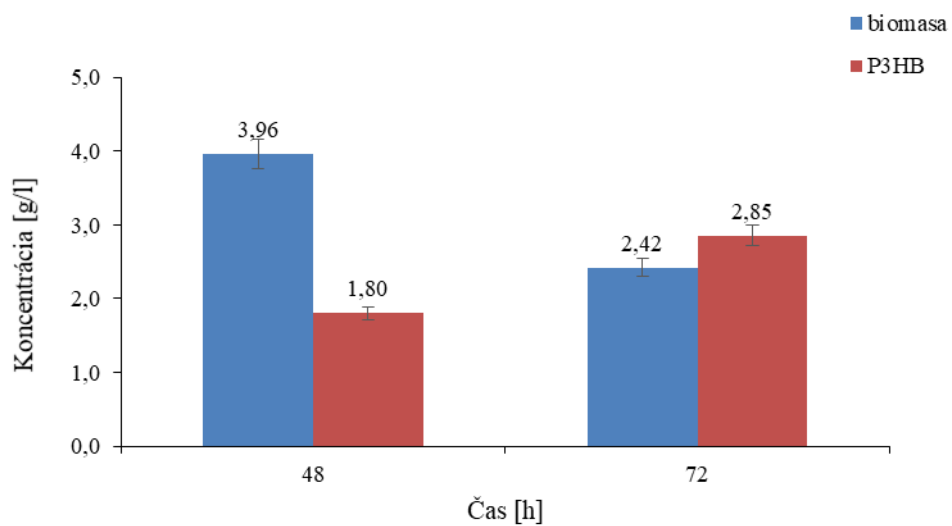
Obrázok 43: Množstvo biomasy a P3HB vo vzorkách s FA o koncentrácii 0,25 g/l pred sterilizáciou média



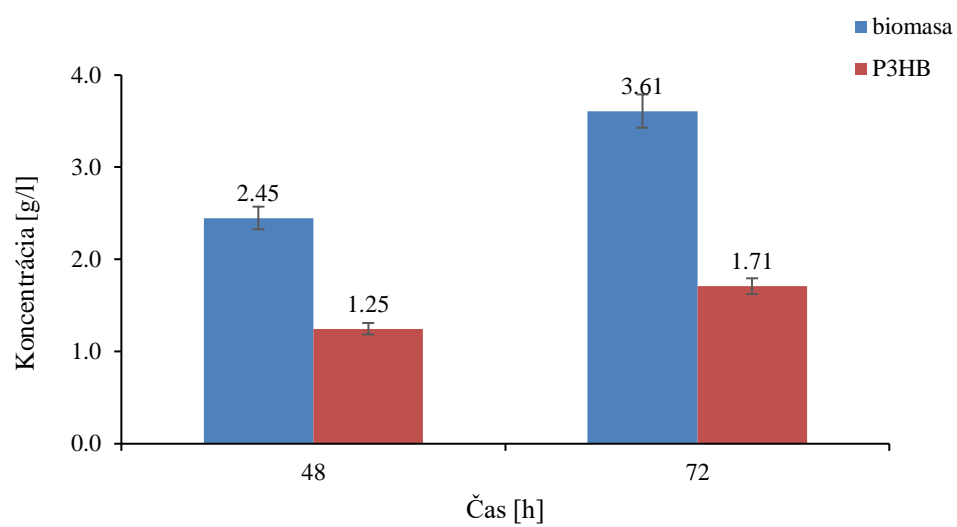
Obrázok 44: Množstvo biomasy a P3HB vo vzorkách s FA o koncentrácii 0,25 g/l po sterilizácii média



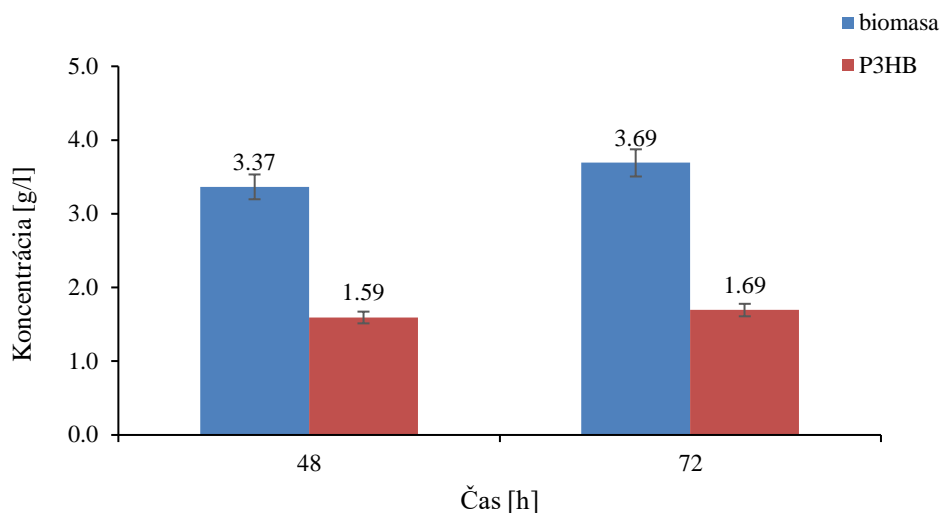
Obrázok 45: Množstvo biomasy a P3HB vo vzorkách s FA o koncentrácii 0,5 g/l pred sterilizáciou média



Obrázok 46: Množstvo biomasy a P3HB vo vzorkách s FA o koncentrácii 0,5 g/l po sterilizácii média



Obrázok 47: Množstvo biomasy a P3HB vo vzorkách s FA o koncentrácii 0,75 g/l pred sterilizáciou média



Obrázok 48: Množstvo biomasy a P3HB vo vzorkách s FA o koncentrácii 0,75 g/l po sterilizácii média

Po 24 hodinách bolo zaznamenané minoritné množstvo biomasy a P3HB vo vzorkách s FA o koncentrácii 0,25 g/l a 0,5 g/l v oboch prípadoch (pred a po sterilizácii média). Najväčšie množstvo biomasy a P3HB bolo vo vzorke s 0,25 g/l FA pred aj po sterilizácii média.

Po 48 hodinách bol pozorovaný už vyšší nárast koncentrácie biomasy aj P3HB vo všetkých vzorkách. Najvyššie množstvo biomasy a P3HB bolo obsiahnuté vo vzorkách s nižšou koncentráciou pridanej kyseliny ferulovej po sterilizácii.

Celková najvyššia koncentrácia biomasy ($5,41 \pm 0,5$ g/l) a P3HB ($3,59 \pm 0,3$ g/l) tohto experimentu bola dosiahnutá po 72. hodinách vo vzorke s FA o koncentrácii 0,25 g/l pred sterilizáciou.

Vyššie koncentrácie biomasy a P3HB boli teda zaznamenané vo vzorkách s FA o nižšej koncentrácii pravdepodobne z toho dôvodu, že prítomnosť kyseliny ferulovej o vyššej koncentrácii inhibovali rast baktérie.

4.6 Bioinformatická analýza transformačnej dráhy kyseliny ferulovej pomocou *S. thermodepolymerans* DSM 15344

Na záver experimentálnej časti bola venovaná pozornosť biotransformačnému procesu kyseliny ferulovej pomocou modelového kmeňa *S. thermodepolymerans* DSM 15344 v spolupráci s Ing. Janou Musilovou, ktorá sa podieľala na anotácii prvého kompletného genómu *S. thermodepolymerans* DSM 15344. Konkrétne boli skúmané enzýmy a gény kódujúce enzýmy, ktoré katalyzovali dekarboxyláciu a β -oxidáciu kyseliny ferulovej (viz kapitola 2.3.1). Jednalo sa o enzýmy:

- Dekarboxyláza kyseliny ferulovej, kódovaná génmi *padC*
- Feruloyl-CoA syntetáza, kódovaná génmi *fcs*
- Enoyl-CoA hydratáza/izomeráza, kódovaná génmi *ech*
- β -ketothioláza, kódovaná génmi *aat*
- Vanilín dehydrogenáza, kódovaná génmi *vdh*

Na porovnanie sekvencií enzýmov baktérie *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 boli vyhladané proteínové FASTA formáty enzýmov referenčných mikroorganizmov a boli využité na analýzu cez nástroj BLASTp s celým genómom baktérie *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 (GenBank: CP064338.1).

Tabuľka 4: Porovnané sekvencie dohľadaných enzýmov referenčných mikroorganizmov s genómom *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344

Enzým (Protein ID)	Organizmus (Ref. sekvencia)	Locus tag	Pokrytie sekvencie [%]	E	Kvalitatívna podobnosť [%]
Feruloyl-CoA syntetáza (QPC33005.1)	<i>Pseudomonas mediterranea</i> (SDU56784.1)	IS481_07640	94%	0,0	57,33%
Leucyl/phenylalanyl-tRNA-protein transferáza (QPC30335.1)	<i>Pseudomonas oleovorans</i> (WP_003460425.1)	IS481_11130	93%	$2 \cdot 10^{-70}$	50,42%

Vyhľadané FASTA formáty génov referenčných baktérii boli porovnané s celým genómom baktérie *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 (GenBank: CP064338.1) pomocou nástroja BLASTn (tabuľka 5).

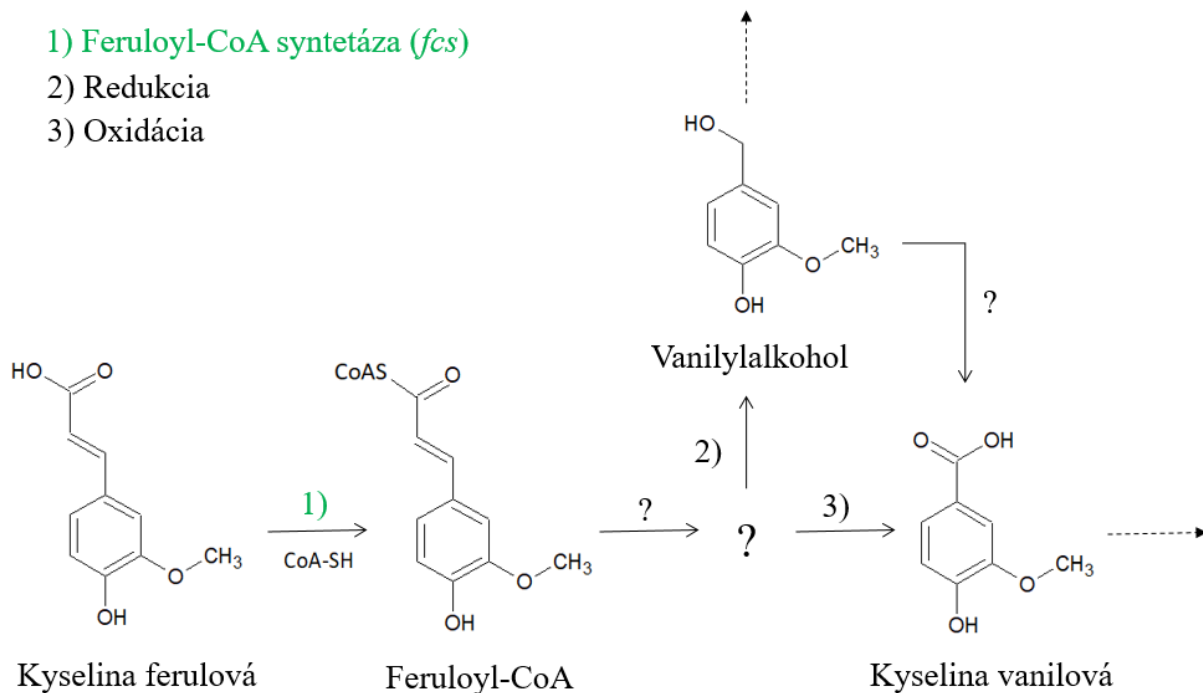
Tabuľka 5: Porovnané sekvencie génov kódujúce dané enzýmy s genómom *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344

Gén	Organizmus (Genomic sequence)	Pokrytie sekvencie [%]	E	Kvalitatívna podobnosť [%]
<i>fcs</i>	<i>Pseudomonas mediterranea</i> DSM 16733 (NZ_LT629790.1)	90%	$1 \cdot 10^{-154}$	68,10%
<i>aat</i>	<i>Pseudomonas oleovorans</i> CECT 5344 (NZ_HG916826.1)	48%	$4 \cdot 10^{-10}$	63,47%

Jedinými dohľadanými génmi v genóme baktérie *S. thermodepolymerans* DSM 15344 boli gény *fcs* a *aat* avšak gén *aat* v genóme kóduje enzým leucyl/phenylalanyl-tRNA-protein transferázu, ktorý nie je súčasťou biotransformačných dráh kyseliny ferulovej.

Presný priebeh metabolizácie kyseliny ferulovej baktériou *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 nie je možné určiť keďže nedošlo k nájdeniu dostatočných génov kódujúce enzýmy už známych metabolických dráh kyseliny ferulovej mikroorganizmami. Dôvodom nedostatku analyzovaných génov môže byť to, že v genóme *S. thermodepolymerans* DSM 15344 ešte viacero génov nemá priradený analóg a neboli anotované. Na Obrázku 49 je načrtnutý hrubý odhad metabolickej dráhy kyseliny ferulovej vzhľadom na dosiahnuté výsledky HPLC analýzy fenolických látok. 4-vinylguaicol bol konvertovaný z FA v mnohých vedeckých štúdiách procesom dekarboxylácie avšak gén s enzýmom dekarboxylázy kyseliny ferulovej nebol pozorovaný v genóme *S. thermodepolymerans* DSM 15344. Iný proces konverzie na 4-VG zatiaľ nie je známy. V tejto práci však 4-VG nebol produktom biotransformácie FA ale vznikal pravdepodobne abioticky pôsobením sterilizácie. Potvrdeným genómom bol gén *fcs*, kódujúci feruloyl-CoA syntetázu, ktorý spolu s CoA thioesterom prevedú FA na feruloyl-CoA. Ďalším krokom smerujúcemu k vzniku kyseliny vanilovej v β -oxidácii FA by mal byť gén *ech*, kódujúci enoyl-CoA hydratázu/aldolázu. Tento gén ale nebol prítomný v genóme *S. thermodepolymerans* DSM 15344 a preto nasledujúci medziprodukt je v prípade tejto baktérie neznámy. Pravdepodobnými nasledujúcimi procesmi je oxidácia na kyseliny vanilové

alebo redukcia na vanilylalkohol. Redukčné a oxidačné reakcie v mnohých odborných prácach vychádzali z vanilínu, avšak v tejto práci vanilín detegovaný nebol. Vanilín mohol byť produkovaný baktériou intracelulárne a vzhľadom na to, že je pre baktérie toxický, je možné, že bol vanilín v tejto práci okamžite detoxifikovaný na VA a VanOH. Na základe dosiahnutých výsledkov sa dá však ešte uvažovať nad cestou prevedenia VanOH na VA, čo bolo možné pozorovať zmenou koncentrácií týchto metabolitov, kedy koncentrácia VanOH sa znižovala zatiaľ čo VA pribúdala. VanOH a VA ďalej mohli podliehať degradácii na ďalšie fenolové látky (na Obrázku 49 vyznačené bodkovanou čiarou).



Obrázok 49: Pravdepodobná biotransformačná dráha kyseliny ferulovej pomocou baktérie *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344

5 ZÁVER

Táto diplomová práca sa zaoberala biotransformáciou kyseliny ferulovej na senzorycky aktívne látky pomocou vybraných bakteriálnych kmeňov *Schlegelella thermodepolymerans*. Boli prevedené viaceré experimenty zamerané na optimalizáciu biotransformačného procesu s hlavným záujmom o produkciu senzorycky aktívnych látok ako kyselina vanilová a vanilylalkohol, ktoré sú cennými látkami v potravinárskom, farmaceutickom a kozmetickom priemysle. Súčasťou praktickej časti bolo aj zameranie sa na pochopenie metabolizmu kyseliny ferulovej baktériou *S. thermodepolymerans*. Okrem biotransformačného procesu sa práca zaoberala aj schopnosťou tejto termofilnej baktérie produkovať poly-3-hydroxybutyrát, ktorý svojou biodegradabilitou a biokompatibilitou by mohol nahradiť konvenčné plasty.

Prvým experimentom bolo otestovanie produkcie P3HB a biotransformačných schopností 3 rôznych kmeňov baktérie *Schlegelella thermodepolymerans* a to M 15344, DSM 15264 a LMG 21645. Kyselina ferulová bolo úplne spotrebovaná všetkými bakteriálnymi kmeňmi už do 24 hodín kultivácie. K najväčšej biotransformácii došlo u kmeňa LMG 21645 a to najmä v 24 hodine. Bakteriálne kmene boli schopné produkovať aj P3HB s najvyššími výťažkami v čase 72 hodín.

Ďalej nasledoval experiment v ktorom sa skúmal vplyv koncentrácie kyseliny ferulovej na biotransformačné procesy a produkciu P3HB pomocou kmeňa M 15344. Tu nastal problém s nameranou koncentráciou FA v čase 0 hodín. Rozdiel v koncentrácii FA zmeranej v čase 0 hodín a počiatočnej naváženej koncentrácii FA bol výrazne vyšší pri počiatočných koncentráciách 500 mg/l a viac vo všetkých experimentoch. Mohlo to byť spôsobené viacerými spomínanými faktormi: neskorší čas odberu, dekarboxylácia FA na 4-VG pri sterilizácii, prídavok komponent do produkčného média, nepresné naváženie a prevedenie FA do Erlenmeyerovej banky. HPLC analýzou bolo potvrdené, že aj v prípade vyššej počiatočnej koncentrácie FA (700 mg/l) bola FA kompletne spotrebovaná kmeňom M 15344 v priebehu 24 hodín. Bolo dokázané, že použitím vyšších počiatočných koncentrácií FA prevažuje konverzia FA na VanOH, kým pri nižších počiatočných koncentrácií FA dochádza vyhradene ku konverzii na VA. Tento parameter by sa dal využiť na cielelnú biotechnologickú produkciu VA alebo VanOH. K najvyššej produkcii P3HB došlo pri FA o počiatočnej koncentrácii 300 mg/l v čase 72 hodín. Vyššie koncentrácie FA už pravdepodobne inhibovali rast a produkčné schopnosti kultúry.

Vzhľadom na neštandardné chovanie kmeňa M 15344 lyofilizovaného v českej zbierke mikroorganizmov bol v zostávajúcich experimentoch použitý pôvodný modelový kmeň DSM 15344 z nemeckej zbierky mikroorganizmov. Keďže v predošlých experimentoch už nebola po 24 hodinách detegovaná kyselina ferulová, bolo ďalšou úlohou zistiť za aký čas dochádza k metabolizácii kyseliny ferulovej v štvorhodinových intervaloch po dobu 24 hodín. HPLC analýzou bolo dokázané, že kyselina ferulová o koncentrácii 500 mg/l bola kompletne metabolizovaná už do 8 hodín. K vysokej konverzii na vanilylalkohol došlo v 8. hodine a k významnej biotransformácii došlo v 20. hodine, kedy došlo k vzniku kyseliny vanilovej o veľmi vysokej koncentrácii vzhľadom na počiatočnú koncentráciu FA. Zostrojená rastová krivka baktérie naznačila, že rastová fáza pokračovala do 72 hodín, čo potvrdzuje aj najväčšie množstvo biomasy v tomto čase. P3HB však dosiahlo maximum v čase 48 hodín.

Ďalej bolo abiotickou kontrolou overené, že kyselina ferulová v neprítomnosti mikroorganizmov samovoľne nedegraduje počas temperácie na trepačke, avšak množstvo

kyseliny ferulovej zaznamené v čase 0 hodín sa naďalej nezhodovalo s naváženou koncentráciou kyseliny ferulovej pred jej pridaním do produkčného média. Okrem kyseliny ferulovej boli detegované aj nižšie koncentrácie 4-vinylguaiacolu, ktorý mohol byť produkovaný dekarboxylačnými reakciami pri sterilizácii. 4-VG teda určite nebol produktom biotransformácie FA.

Posledným kultivačným experimentom bola analýza biotransformácie kyseliny ferulovej a produkcie P3HB v prípade vzoriek, ktoré obsahovali kyselinu ferulovú pred sterilizáciou produkčného média a v prípade vzoriek, ktoré obsahovali kyselinu ferulovú až po sterilizácii produkčného média s cieľom porovnania počiatkovej koncentrácie kyseliny ferulovej s koncentráciou nameranou v čase 0 hodín. Koncentrácia kyseliny ferulovej v odbere 0 hodín bola rovnaká vo vzorkách s kyselinou ferulovou pred aj po sterilizácii, čím bolo dokázané, že sterilizácia nespôsobovala zníženie naváženej koncentrácie na nižšiu koncentráciu v prvom odbere (0 hodín). 4-vinylguaiacol bol detegovaný vo vyššej koncentrácii vo vzorkách s obsahom kyseliny ferulovej pred sterilizáciou. Vysoká teplota a tlak pri sterilizácii bola pravdepodobne dôvodom vzniku vyšších koncentrácií 4-vinylguaiacolu. K najväčšej biotransformácii kyseliny ferulovej na vanilylalkohol prebiehalo pri vyšších počiatkových koncentráciách kyseliny ferulovej a to najmä v časovom intervale 8–16 hodín. K najvyššej biokonverzii na kyselinu vanilovú došlo pri koncentrácii 500 mg/l kyseliny ferulovej v čase 16 hodín. Vyššie koncentrácie P3HB a biomasy boli pozorované pri nižších koncentráciách kyseliny ferulovej, ktorá bola pridaná do produkčného média pred sterilizáciou. Najvyššie množstvo P3HB bolo namerané pri 250 mg/l kyseliny ferulovej po 72 hodinách.

Na záver praktickej časti diplomovej práce bola prevedená bioinformatická analýza metabolických dráh kyseliny ferulovej. Porovnaním referenčných nukleotidových sekvencií génov a proteínových sekvencií enzýmov bola v génome *S. thermodepolymerans* DSM 15344 overená jediná prítomnosť génu *fcs*, podieľajúceho sa na počiatkovej reakcii smerujúcej k vzniku kyseliny vanilovej a vanilylalkoholu. Metabolizmus FA baktériou *S. thermodepolymerans* DSM 15344 je teda spojený s procesom β -oxidácie FA, kde prvým krokom je FA prevedená na feruloyl-CoA katalyzovaný feruloyl-CoA syntetázou (kódovaná génmi *fcs*). Nedostatkou potvrdených génov v génome baktérie *S. thermodepolymerans* teda nebolo možné sa dopracovať ku kompletnej metabolickej dráhe kyseliny ferulovej. Konverzia na VanOH a VA pravdepodobne prebieha cez vanilín, ktorý musel byť okamžite prevedený na tieto menej toxické zlúčeniny. Alternatívnou cestou k VA na základe dosiahnutých výsledkov by mohlo byť aj oxidácia VanOH.

Dôležitým zistením tejto diplomovej práce bolo, že termofilná baktéria *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 preukazuje výnimočne rýchlu utilizáciu kyseliny ferulovej spojenú s produkciou iných fenolických látok. Okrem toho bol baktériou vyprodukovaný P3HB s najvyššími výťažkami v časoch 48 a 72 hodín v prítomnosti kyseliny ferulovej o nižšej počiatkovej koncentrácii. Najvyššími výťažkami biotransformácie kyseliny ferulovej bola kyselina vanilová a vanilylalkohol. Bolo dokázané, že k najefektívnejšej produkcii kyseliny vanilovej dochádzalo pri FA o počiatkových koncentráciách 250 mg/l resp. 300 mg/l a 500 mg/l v čase 8–24 hodín. Biokonverzia na vanilylalkohol bola najvyššia pri vyššej počiatkovej koncentrácii FA 750 mg/l a to v čase 8–16 hodín. Hlavným biotransformačným oknom teda bol časový interval 8–24 hodín, kde v závislosti na počiatkovej koncentrácii kyseliny ferulovej dochádzalo k produkcii kyseliny vanilovej oxidačnou cestou, k produkcii vanilylalkoholu redukčnou cestou biotransformácie kyseliny ferulovej alebo ešte prevedením VanOH na VA.

S. thermodepolymerans DSM 15344 teda na základe dosiahnutých výťažkov fenolových látok a P3HB pravdepodobne najskôr detoxifikuje FA za vzniku látok s pridanou hodnotou a od 24. hodiny využíva xylózu ako zdroj uhlíka na produkciu P3HB s najvyššími výťažkami v čase 48 až 72 hodín. Vzhľadom na dosiahnuté výsledky vysokých výťažkov senzoricke aktívnych látok sa dá tvrdiť, že baktéria *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 má potenciál na produkciu týchto látok biotransformáciou kyseliny ferulovej. Bioinformatickou analýzou bol potvrdený len jeden gén *fcs* podieľajúci sa na β -oxidácii FA a preto by bolo ďalej bude nutné sa dopracovať k anotácii ďalších génov podieľajúcich sa na biotransformácii kyseliny ferulovej baktériou *S. thermodepolymerans* DSM 15344 na upresnenie metabolickej dráhy FA. Problematikou optimalizácie biotransformačných procesov kyseliny ferulovej pomocou baktérie *Schlegelella thermodepolymerans* by bolo teda vhodné sa naďalej podrobnejšie venovať so zameraním na kratšie časové úseky odberov do 24 hodín pre lepšie pochopenie metabolizácie kyseliny ferulovej.

6 ZDROJE

- [1] O'GRADY, John, Ultan CRONIN, Joseph TIERNEY, Anna V. PITERINA, Elaine O'MEARA a Martin G. WILKINSON. Gaps in the assortment of rapid assays for microorganisms of interest to the dairy industry. *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, 2020, 2020, **113**, 1-56. *Advances in Applied Microbiology*. ISBN 9780128207093. Dostupné z: doi:10.1016/bs.aambs.2020.07.001
- [2] PANDA, Amrita K., Satpal S. BISHT, Surajit DE MANDAL a N. Senthil KUMAR. Microbial Diversity of Thermophiles Through the Lens of Next Generation Sequencing. *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Elsevier, 2019, 2019, , 217-226. ISBN 9780128148495. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814849-5.00013-7
- [3] MOHAMMAD, Balsam T., Hala I. AL DAGHISTANI, Atef JAOUANI, Saleh ABDEL-LATIF a Christian KENNES. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. *International Journal of Microbiology*. 2017, 2017, 1-12. ISSN 1687-918X. Dostupné z: doi:10.1155/2017/6943952
- [4] ZELDES, Benjamin M., Matthew W. KELLER, Andrew J. LODER, Christopher T. STRAUB, Michael W. W. ADAMS a Robert M. KELLY. Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2015.01209
- [5] O'GRADY, John, Ultan CRONIN, Joseph TIERNEY, Anna V. PITERINA, Elaine O'MEARA a Martin G. WILKINSON. Gaps in the assortment of rapid assays for microorganisms of interest to the dairy industry. *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, 2020, 2020, **113**, 1-56. *Advances in Applied Microbiology*. ISBN 9780128207093. Dostupné z: doi:10.1016/bs.aambs.2020.07.001 SILHAVY, T. J., D.
- [6] KAHNE a S. WALKER. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010, **2**(5), a000414-a000414. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a000414
- [7] BEAL, H. Microbial Life in Extremely Hot Environments. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. 2002. Dostupné z: <https://serc.carleton.edu/8347>
- [8] ELBANNA, Khaled, Tina LÜTKE-EVERSLOH, Stefanie VAN TRAPPEN, Joris MERGAERT, Jean SWINGS a Alexander STEINBÜCHEL. *Schlegelella thermodepolymerans* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic bacterium that degrades poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003, **53**(4), 1165-1168. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.02562-0
- [9] SEHGAL, Rutika a Reena GUPTA. Polyhydroxyalkanoate and its efficient production: an eco-friendly approach towards development. *3 Biotech*. 2020, **10**(12). ISSN 2190-572X. Dostupné z: doi:10.1007/s13205-020-02550-5
- [10] ANGRA, Vani, Rutika SEHGAL a Reena GUPTA. Trends in PHA Production by Microbially Diverse and Functionally Distinct Communities. *Microbial Ecology*. 2023, **85**(2), 572-585. ISSN 0095-3628. Dostupné z: doi:10.1007/s00248-022-01995-w
- [11] KOURILOVA, Xenie, Iva PERNICOVA, Karel SEDLAR, Jana MUSILOVA, Petr SEDLACEK, Michal KALINA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of *Schlegelella*

- thermodepolymerans from xylose rich substrates. *Bioresource Technology*. 2020, **315**. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123885
- [12] MUSILOVA, Jana, Xenie KOURILOVA, Matej BEZDICEK, Martina LENGEROVA, Stanislav OBRUCA, Helena SKUTKOVA, Karel SEDLAR a Howard OCHMAN. First Complete Genome of the Thermophilic Polyhydroxyalkanoates-Producing Bacterium *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344. *Genome Biology and Evolution*. 2021, **13**(4). ISSN 1759-6653. Dostupné z: doi:10.1093/gbe/evab007
- [13] KOURILOVA, Xenie, Ivana NOVACKOVA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Evaluation of mesophilic *Burkholderia sacchari*, thermophilic *Schlegelella thermodepolymerans* and halophilic *Halomonas halophila* for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*. 2021, **325**. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124704
- [14] CHOU, Yi-Ju, Shih-Yi SHEU, Der-Shyan SHEU, Jih-Terng WANG a Wen-Ming CHEN. *Schlegelella aquatica* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2006, **56**(12), 2793-2797. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.64446-0
- [15] RAGHUNATHAN, Govindan a Andreas MARX. Identification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase variants with increased mismatch discrimination and reverse transcriptase activity from a smart enzyme mutant library. *Scientific Reports*. 2019, **9**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-37233-y
- [16] PANDEY, Anita, Kusum DHAKAR, Avinash SHARMA, Payal PRITI, Priyanka SATI a Bhavesh KUMAR. Thermophilic bacteria that tolerate a wide temperature and pH range colonize the Soldhar (95 °C) and Ringigad (80 °C) hot springs of Uttarakhand, India. *Annals of Microbiology*. 2015, **65**(2), 809-816. ISSN 1590-4261. Dostupné z: doi:10.1007/s13213-014-0921-0
- [17] INNIS, M A, K B MYAMBO, D H GELFAND a M A BROW. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988, **85**(24), 9436-9440. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.85.24.9436
- [18] LI, Jing, Wenting ZHAO, Xin PAN, Fei LAO, Xiaojun LIAO, Yong SHI a Jihong WU. Improvement of antioxidant properties of jujube puree by biotransformation of polyphenols via *Streptococcus thermophilus* fermentation. *Food Chemistry: X*. 2022, **13**. ISSN 25901575. Dostupné z: doi:10.1016/j.fochx.2022.100214
- [19] MINATEL, Igor Otavio, Cristine Vanz BORGES, Maria Izabela FERREIRA, Hector Alonzo Gomez GOMEZ, Chung-Yen Oliver CHEN a Giuseppina Pace Pereira LIMA. Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. *Phenolic Compounds - Biological Activity*. InTech, 2017, 2017-03-08. ISBN 978-953-51-2959-2. Dostupné z: doi:10.5772/66368
- [20] BALASUNDRAM, Nagendran, Kalyana SUNDRAM a Samir SAMMAN. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006, **99**(1), 191-203. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.042
- [21] LIN, Derong, Mengshi XIAO, Jingjing ZHAO, et al. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules*. 2016, **21**(10). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules21101374

- [22] ROBARDS, Kevin, Paul D PRENZLER, Greg TUCKER, Prasan SWATSITANG a William GLOVER. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*. 1999, **66**(4), 401-436. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/S0308-8146(99)00093-X
- [23] BENDARY, E., R.R. FRANCIS, H.M.G. ALI, M.I. SARWAT a S. EL HADY. Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences*. 2013, **58**(2), 173-181. ISSN 05701783. Dostupné z: doi:10.1016/j.aosas.2013.07.002
- [24] LIN, Derong, Mengshi XIAO, Jingjing ZHAO, et al. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules*. 2016, **21**(10). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules21101374
- [25] ANANTHARAJU, Preethi G., Prathima C. GOWDA, Manjunatha G. VIMALAMBIKE a SubbaRao V. MADHUNAPANTULA. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutrition Journal*. 2016, **15**(1). ISSN 1475-2891. Dostupné z: doi:10.1186/s12937-016-0217-2
- [26] FRANCENIA SANTOS-SÁNCHEZ, Norma, Raúl SALAS-CORONADO, Beatriz HERNÁNDEZ-CARLOS a Claudia VILLANUEVA-CAÑONGO. Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*. IntechOpen, 2019, 2019-9-4. ISBN 978-1-78984-033-9. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.83815
- [27] KUMAR, Naresh a Vikas PRUTHI. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*. 2014, **4**, 86-93. DOI: 10.1016/j.btre.2014.09.002. ISSN 2215017X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215017X14000368>
- [28] MADEIRA JUNIOR, Jose Valdo, Camilo Barroso TEIXEIRA a Gabriela Alves MACEDO. Biotransformation and bioconversion of phenolic compounds obtainment: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2013, 35(1), 75-81. ISSN 0738-8551. Dostupné z: doi:10.3109/07388551.2013.803020
- [29] H. AL MAMARI, Hamad. Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis. Phenolic Compounds - Chemistry, Synthesis, Diversity, Non-Conventional Industrial, Pharmaceutical and Therapeutic Applications. IntechOpen, 2022, 2022-2-23. *Biochemistry*. ISBN 978-1-83969-346-5. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.98958
- [30] E.BURKE, Karen. Chapter 8 - Prevention and Treatment of Aging Skin with Topical Antioxidants: Lecture Notes from the 2nd ERCOFTAC Summerschool held in Stockholm, 10-16 June, 1998. E.BURKE, Karen. *Skin Aging Handbook: An Integrated Approach to Biochemistry and Product Development*. 2009. 13 Eaton Avenue Norwich, NY 13815: William Andrew, 2009, 1999, s. 149-176. ISBN 9780815515845.
- [31] WATSON, Ronald Ross. Chapter 6 - Clerodendrum volubile: Phenolics and Applications to Health. *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*. 2018, 2018, s. 53-68. DOI: 10.1016/C2016-0-04277-8. ISBN 9780128130063.
- [32] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 445858, Ferulic acid; [cited 2020 Nov. 8]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferulic-acid>
- [33] CHEN, Zhenya, Xiaolin SHEN, Jian WANG, Jia WANG, Ruihua ZHANG, Justin Forrest REY, Qipeng YUAN a Yajun YAN. Establishing an Artificial Pathway for De

- Novo Biosynthesis of Vanillyl Alcohol in *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology*. 2017, **6**(9), 1784-1792. ISSN 2161-5063. Dostupné z: doi:10.1021/acssynbio.7b00129
- [34] JUNG, Hyun-Joo, Yun Seon SONG, Chang-Jin LIM a Eun-Hee PARK. Anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of vanillyl alcohol. *Archives of Pharmacal Research*. 2008, **31**(10), 1275-1279. ISSN 0253-6269. Dostupné z: doi:10.1007/s12272-001-2106-1
- [35] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 62348, Vanillyl alcohol; [cited 2020 Nov. 8]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vanillyl-alcohol>
- [36] SHARMA, Neha, Nishtha TIWARI, Manish VYAS, Navneet KHURANA, Arunachalam MUTHURAMAN a Puneet UTREJA. An Overview of Therapeutic effects of Vanillic Acid. *Plant Archives*. 2020, **20**(2), 3053-3059. ISSN 0972-5210.
- [37] ALZWEIRI, Muhammed a Yusuf AL-HIARI. Evaluation of vanillic acid as inhibitor of carbonic anhydrase isozyme III by using a modified Hummel-Dreyer method: approach for drug discovery. *Biomedical Chromatography*. 2013, **27**(9), 1157-1161. ISSN 02693879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.2921
- [38] KAUR, Jaskiran, Monica GULATI, Sachin Kumar SINGH, et al. Discovering multifaceted role of vanillic acid beyond flavours: Nutraceutical and therapeutic potential. *Trends in Food Science & Technology*. 2022, **122**, 187-200. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2022.02.023
- [39] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 8468, Vanillic acid; [cited 2020 Nov. 10]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vanillic-acid>
- [40] CHATTOPADHYAY, Pritam, Goutam BANERJEE a Sukanta K. SEN. Cleaner production of vanillin through biotransformation of ferulic acid esters from agroresidue by *Streptomyces sannanensis*. *Journal of Cleaner Production*. 2018, 182, 272-279. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2018.02.043
- [41] LUBBERS, Ronnie J. M., Adiphol DILOKPIMOL, Paula A. NOUSIAINEN, Răzvan C. CIOC, Jaap VISSER, Pieter C. A. BRUIJNINCX a Ronald P. DE VRIES. Vanillic acid and methoxyhydroquinone production from guaiacyl units and related aromatic compounds using *Aspergillus niger* cell factories. *Microbial Cell Factories*. 2021, **20**(1). ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-021-01643-x
- [42] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 1183, Vanillin; [cited 2020 Nov. 10]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vanillin>
- [43] BAQUEIRO-PEÑA, Itzamná, Gabriela RODRÍGUEZ-SERRANO, Eduardo GONZÁLEZ-ZAMORA, Christopher AUGUR, Octavio LOERA a Gerardo SAUCEDO-CASTAÑEDA. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 2010, **101**(12), 4721-4724. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2010.01.086
- [44] LEE, In-Young, Timothy G VOLM a John P.N ROSAZZA. Decarboxylation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by *Bacillus pumilus* in aqueous-organic solvent two-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998, **23**(3-4), 261-266. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-0229(98)00044-1
- [45] ITO, Toshihiko, Mahito KONNO, Yoichiro SHIMURA, Seiei WATANABE, Hitoshi TAKAHASHI a Katsumi HASHIZUME. Formation of Guaiacol by Spoilage Bacteria

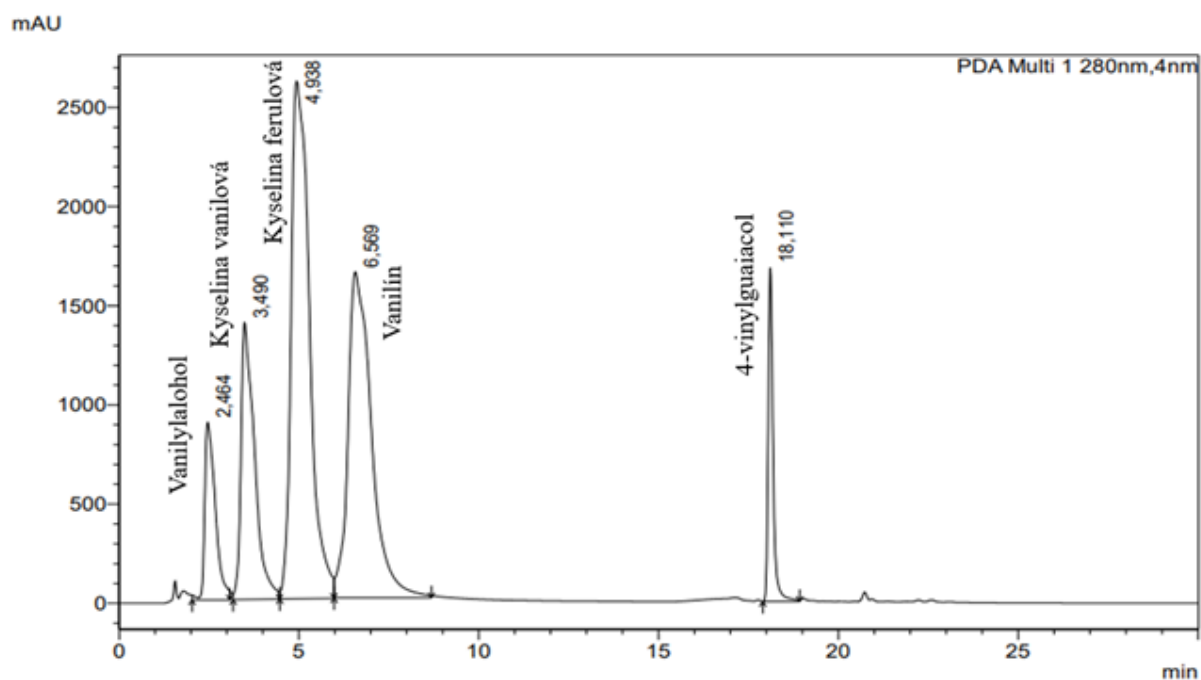
- from Vanillic Acid, a Product of Rice Koji Cultivation, in Japanese Sake Brewing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016, **64**(22), 4599-4605. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.6b01031
- [46] LI, Lulu, Liangkun LONG a Shaojun DING. Bioproduction of High-Concentration 4-Vinylguaiacol Using Whole-Cell Catalysis Harboring an Organic Solvent-Tolerant Phenolic Acid Decarboxylase From *Bacillus atrophaeus*. *Frontiers in Microbiology*. 2019, 10, 1798. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.01798
- [47] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 332, 2-Methoxy-4-vinylphenol; [cited 2020 Nov. 14]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Methoxy-4-vinylphenol>
- [48] KYNADI, Anna S. a T. V. SUCHITHRA. Bacterial Degradation of Phenol to Control Environmental Pollution. *Microbial Biotechnology*. Singapore: Springer Singapore, 2017, 2017-02-08, 245-263. ISBN 978-981-10-6846-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-6847-8_11
- [49] MAX, Belén, Julia CARBALLO, Sandra CORTÉS a Jose M. DOMÍNGUEZ. Decarboxylation of Ferulic Acid to 4-Vinyl Guaiacol by *Streptomyces setonii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012, **166**(2), 289-299. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-011-9424-7
- [50] GULSUNOGLU-KONUSKAN, Zehra a Meral KILIC-AKYILMAZ. Microbial Bioconversion of Phenolic Compounds in Agro-industrial Wastes: A Review of Mechanisms and Effective Factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.1c06888
- [51] REJANI, Chalikkaran Thilakan a Sivaramapillai RADHAKRISHNAN. Microbial conversion of vanillin from ferulic acid extracted from raw coir pith. *Natural Product Research*. 2022, **36**(4), 901-908. ISSN 1478-6419. Dostupné z: doi:10.1080/14786419.2020.1849194
- [52] BHUIYA, Mohammad Wadud, Soon Goo LEE, Joseph M. JEZ, Oliver YU a A. A. BRAKHAGE. Structure and Mechanism of Ferulic Acid Decarboxylase (FDC1) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015, **81**(12), 4216-4223. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00762-15
- [53] MATHEW, Sindhu a T. Emilia ABRAHAM. Bioconversions of Ferulic Acid, an Hydroxycinnamic Acid. *Critical Reviews in Microbiology*. 2008, 32(3), 115-125. DOI: 10.1080/10408410600709628. ISSN 1040-841X. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408410600709628>
- [54] BATISTA, Ronan. Uses and Potential Applications of Ferulic Acid. WARREN, Bryce. *Ferulic Acid: Antioxidant Properties, Uses and Potential Health Benefits*. New York, USA: Nova Science Publishers, 2014, s. 39-70. ISBN 978-1-63463-299-7.
- [55] ŚWIZDOR, Alina, Anna PANEK, Natalia MILECKA-TRONINA a Teresa KOŁEK. Biotransformations Utilizing β -Oxidation Cycle Reactions in the Synthesis of Natural Compounds and Medicines. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012, 13(12), 16514-16543. DOI: 10.3390/ijms131216514. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/12/16514>
- [56] GASSON, Michael J., Yoshie KITAMURA, W. Russell MCLAUHLAN, et al. Metabolism of Ferulic Acid to Vanillin. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, **273**(7), 4163-4170. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.273.7.4163

- [57] OVERHAGE, Jörg, Horst PRIEFERT a Alexander STEINBÜCHEL. Biochemical and Genetic Analyses of Ferulic Acid Catabolism in *Pseudomonas* sp. Strain HR199. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, **65**(11), 4837-4847. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.65.11.4837-4847.1999
- [58] TOPAKAS, E., E. KALOGERIS, D. KEKOS, B.J. MACRIS a P. CHRISTAKOPOULOS. Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *LWT - Food Science and Technology*. 2003, **36**(6), 561-565. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/S0023-6438(03)00060-4
- [59] MPOFU, Enock, Joydeep CHAKRABORTY, Chiho SUZUKI-MINAKUCHI, Kazunori OKADA, Toshiaki KIMURA a Hideaki NOJIRI. Biotransformation of Monocyclic Phenolic Compounds by *Bacillus licheniformis* TAB7. *Microorganisms*. 2020, **8**(1). ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms8010026
- [60] FIDDLER, Walter., William Ernest. PARKER, Aaron E. WASSERMAN a Robert C. DOERR. Thermal decomposition of ferulic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1967, **15**(5), 757-761. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf60153a003
- [61] ARRIETA-BAEZ, Daniel, Lidia DORANTES-ÁLVAREZ, Rocio MARTINEZ-TORRES, Gerardo ZEPEDA-VALLEJO, Maria Eugenia JARAMILLO-FLORES, Alicia ORTIZ-MORENO a Gerardo APARICIO-OZORES. Effect of thermal sterilization on ferulic, coumaric and cinnamic acids: dimerization and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2012, **92**(13), 2715-2720. ISSN 00225142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.5695

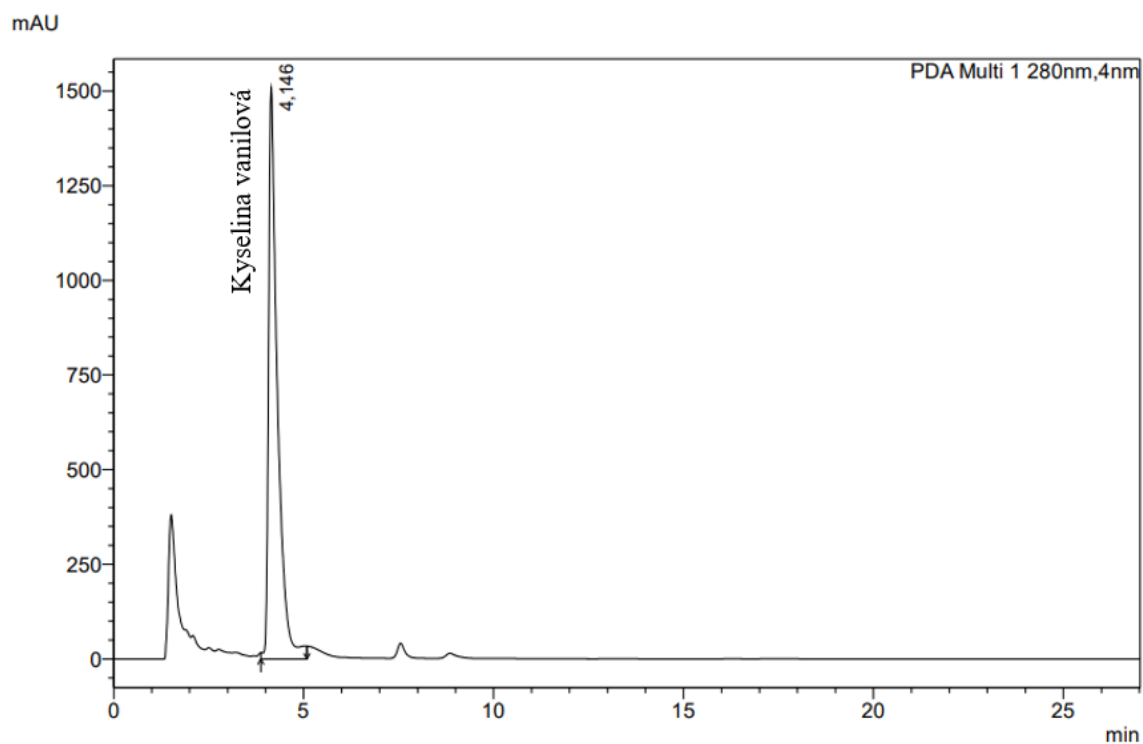
7 ZOZNAM SKRATIEK

Skratka	Význam
4-VG	4-vinylguaiacol
FA	Kyselina ferulová
GC-FID	Plynová chromatografia s plameňovo ionizačným detektorom
HPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
P3HB	Poly-3-hydroxybutyrát
TEM	Transmisný elektrónový mikroskop
VA	Kyselina vanilová
VanOH	Vanilylalkohol

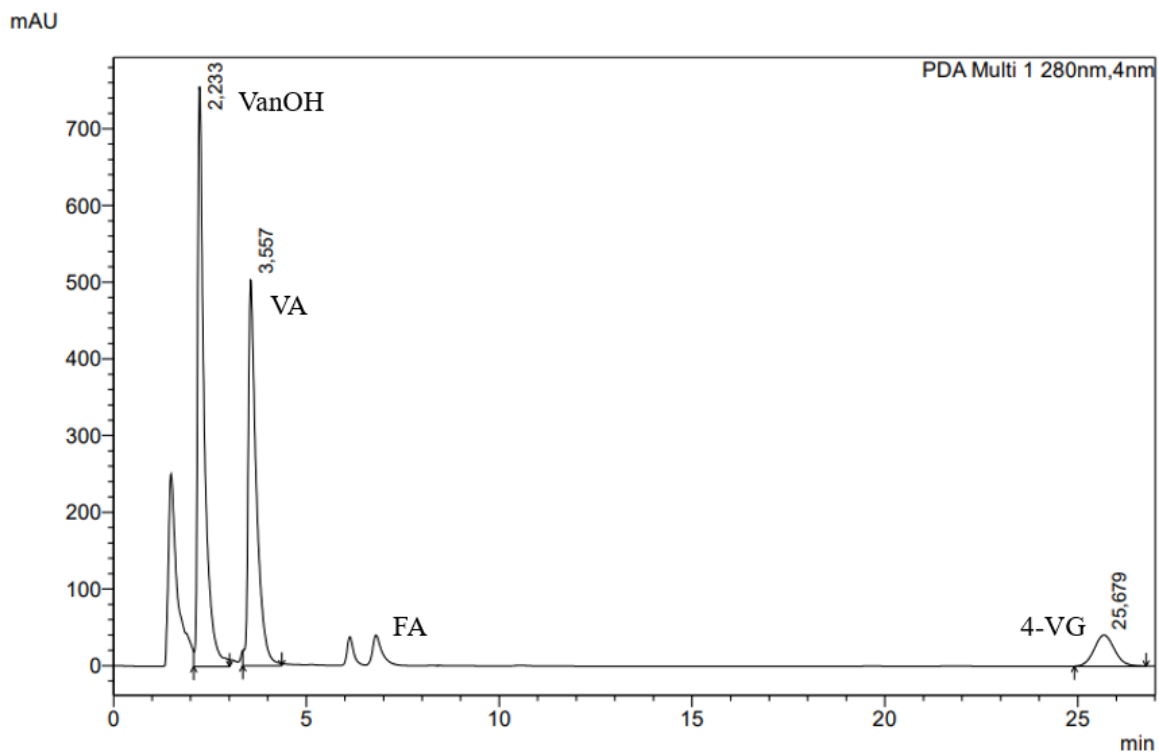
8 ZOZNAM PRÍLOH



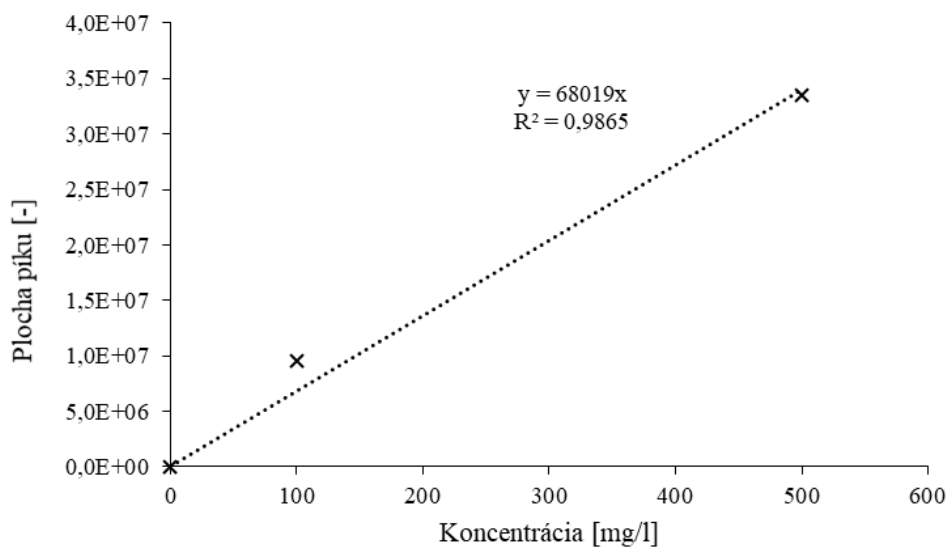
Obrázok 50: Chromatogram použitých štandardov o koncentrácii 500 mg/l



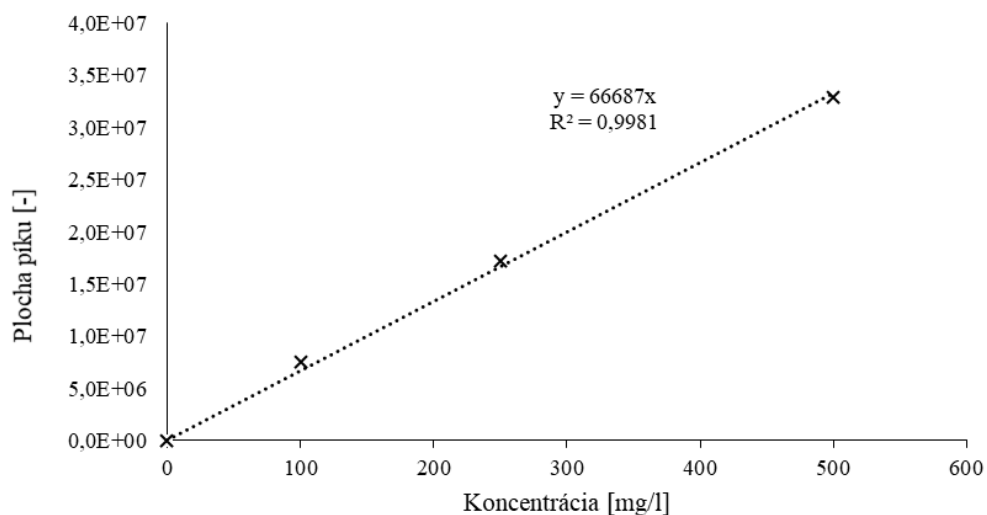
Obrázok 51: Chromatogram s detegovanou kyselinou vanilovou u kmeňu DSM 15344 pri FA o počiatočnej koncentrácii 0,5 g/l v čase 20 hodín



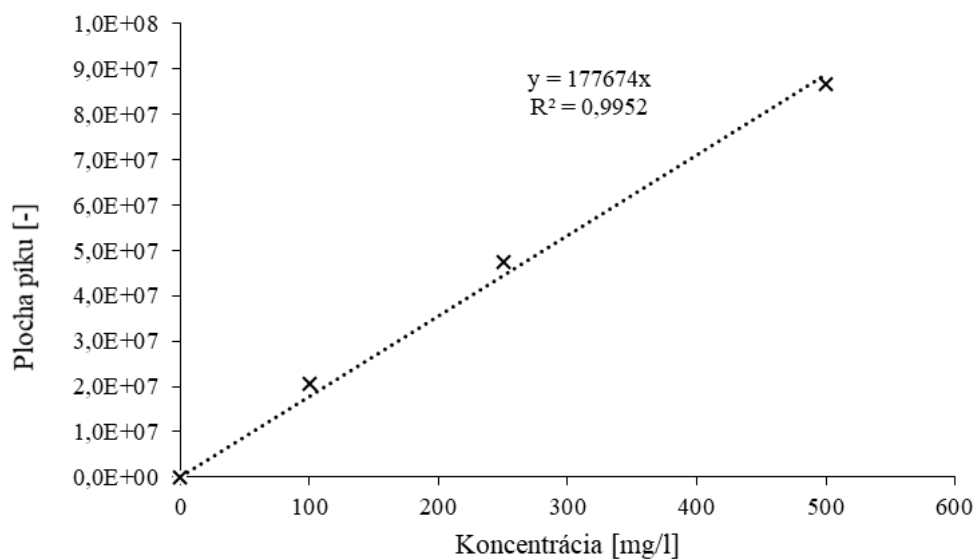
Obrázok 52: Detegované metabolity kyseliny ferulovej u kmeňu DSM 15344 pri FA o počiatkovej koncentrácii 0,5 g/l v čase 8 hodín



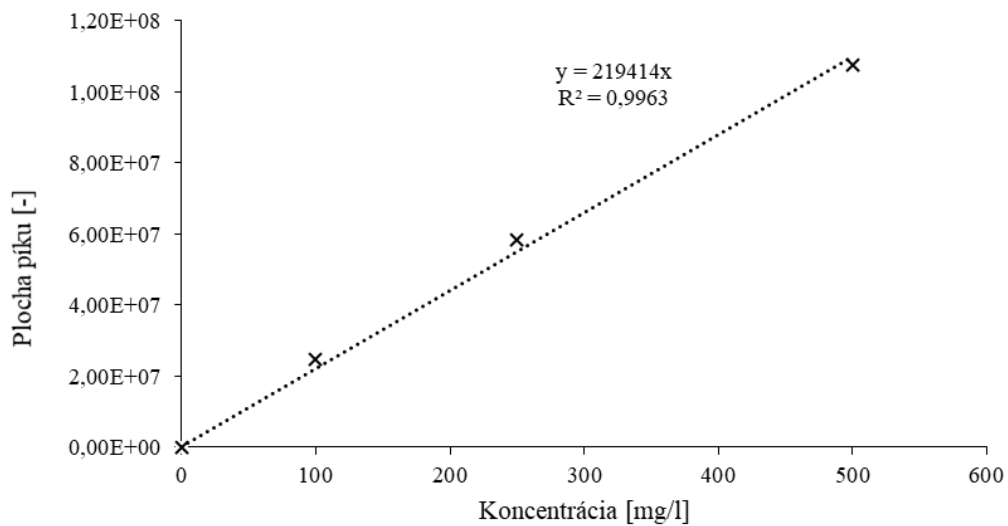
Obrázok 53: Kalibračná krivka pre vanilylalkohol



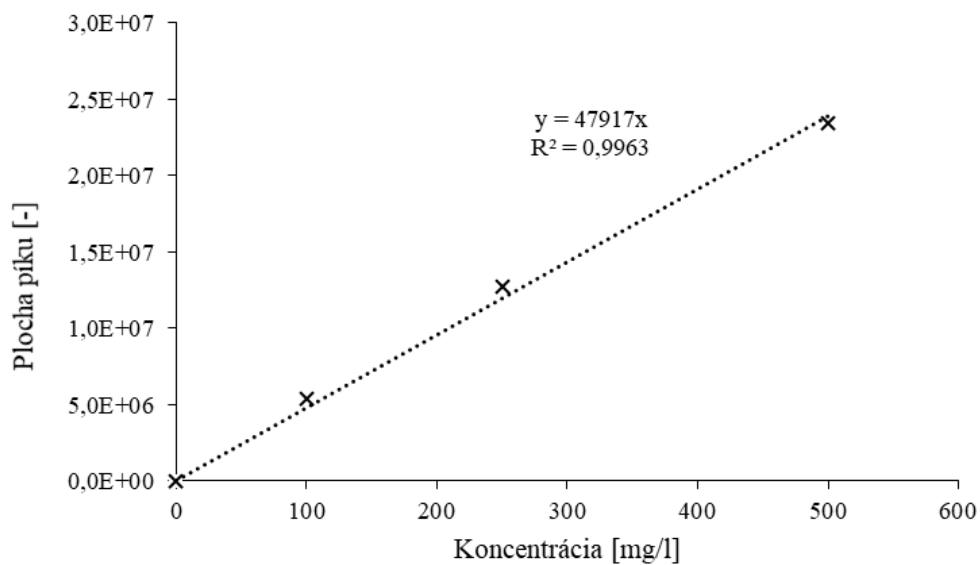
Obrázok 54: Kalibračná krivka pre kyselinu vanilovú



Obrázok 55: Kalibračná krivka pre vanilín



Obrázok 56: Kalibračná krivka pre kyselinu ferulovú



Obrázok 57: Kalibračná krivka pre 4-vinylguaiacol