



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 KYSELINY FERULOVÉ NA
SENZORICKY AKTIVNÍ LÁTKY**

BIOTRANSFORMATION OF FERULIC ACID TO SENSORY ACTIVE COMPOUNDS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tomáš Opial

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1715/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Tomáš Opial**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Biotransformace kyseliny ferulové na senzory aktivní látky

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma.
2. Zavedení HPLC metodiky pro stanovení kyseliny ferulové a jejich metabolitů.
3. Screening biotransformačního potenciálu u vybraných mikroorganismů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Tomáš Opial
student(ka)

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Bakalárska práca sa zaoberala biotransformáciou kyseliny ferulovej na senzorycky aktívne látky. Experiment bol založený na sledovaní biotransformačného potenciálu vybraných mikroorganizmov metódou vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) pričom kultivácia prebiehala v dvoch paralelných prevedeniach a vzorky s pridanou kyselinou ferulovou boli rozdelené na 24 hodinové pôsobenie a 48 hodinové pôsobenie kyseliny ferulovej na bakteriálne kultúry. Bolo zistené, že termofilné baktérie a halofilná baktéria *Halomonas neptunia* sú najvhodnejšími kandidátmi na biotransformáciu kyseliny ferulovej na senzorycky aktívne látky. Pri oboch vzorkách baktérii *Schlegelella thermodepolymerans* (DSM 15344 a DSM 15264) došlo k vzniku 33 mg/l a 76 mg/l kyseliny vanilovej a 81 mg/l a 71 mg/l 4-vinylguaiacolu po 24 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej. U vzorky s baktériou *T. taiwanensis* po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej vzniklo 61 mg/l kyseliny vanilovej a 32 mg/l 4-vinylguaiacolu a u vzorky *R. xylanophilus* 56 mg/l 4-vinylguaiacolu. U vzorky s baktériou *H. neptunia* po 24 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej došlo k jej premene na 296 mg/l kyseliny vanilovej, čo činilo až 59% konverzie pôvodnej kyseliny ferulovej a u vzorky s baktériou *H. organivorans* po 24 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej vzniklo 71 mg/l kyseliny vanilovej. Avšak po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej kyselina vanilová degradovala. Okrem screeningu biotransformačného potenciálu sa vykonalo aj porovnanie sekvencie bakteriálnych enzýmov, podieľajúcich sa na biotransformácii, s proteínovými sekvenciami v databáze pomocou vyhľadávacieho nástroja BLAST. Prítomnosť génov kódujúcich enzýmy podieľajúcich sa na biotransformácii bola dokázaná takmer pre všetky používané mikroorganizmy okrem baktérie *H. neptunia*, pre ktorú nebol dokázaný ani jeden gén. Najväčší počet prítomných génov u baktérii bol pri enzýmoch feruloyl-CoA-syntetáza, enoyl-CoA hydratáza/izomeráza, acetoacetyl-CoA thioláza a vanilín dehydrogenáza.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Kyselina ferulová, biotransformácia, metabolity, vanillylalkohol, kyselina vanilová, vanilín, 4-vinylguaiacol, *Cupriavidus*, *Halomonas*, termofilné baktérie

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with the biotransformation of ferulic acid to sensory active substances. The experiment was based on monitoring the biotransformation potential of selected microorganisms by high performance liquid chromatography (HPLC) method while the cultivation was performed in two parallel runs and samples with added ferulic acid were divided into 24-hour effect and 48-hour effect of ferulic acid on bacterial cultures. Thermophilic bacteria and halophilic bacterium *Halomonas neptunia* have been found to be the most suitable candidates for the biotransformation of ferulic acid to sensory active substances. In both samples of *Schlegelella thermodepolymerans* (DSM 15344 and DSM 15264) was formed 33 mg/l and 76 mg/l of vanillic acid and 81 mg/l and 71 mg/l of 4-vinylguaiacol after 24 hours of ferulic acid effect. In a sample with *T. taiwanensis* was formed 61 mg/l of vanillic acid and 32 mg/l of 4-vinylguaiacol after 48 hours of ferulic acid effect, and in a sample of *R. xylanophilus* was formed 56 mg/l of 4-vinylguaiacol. In the sample with *H. neptunia* after 24 hours of ferulic acid effect was formed 296 mg/l of vanillic acid, which was up to 59% of the conversion of the added ferulic acid and in a sample with *H. organivorans* after 24 hours of ferulic acid effect was formed 71 mg/l of vanillic acid. However, after 48 hours of ferulic acid effect, vanillic acid degraded. In addition to screening of biotransformation potential, the sequence of bacterial enzymes, involved in biotransformation, was also compared with protein sequences in the database using the BLAST search tool. The presence of genes encoding enzymes involved in biotransformation has been demonstrated for almost all used microorganisms except *H. neptunia*, for which no gene has been identified. The highest number of genes present in bacteria was with the enzymes feruloyl-CoA synthetase, enoyl-CoA hydratase/isomerase, acetoacetyl-CoA thiolase and vanillin dehydrogenase.

KEYWORDS

Ferulic acid, biotransformation, metabolites, vanillyl alcohol, vanillic acid, vanillin, 4-vinylguaiacol, *Cupriavidus*, *Halomonas*, thermophilic bacteria

OPIAL, Tomáš. Biotransformace kyseliny ferulové na sensoricky aktivní látky . Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131526>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

PREHLÁSENIE

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

.....

podpis študenta

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som rád poďakoval svojmu vedúcemu bakalárskej práce pánovi doc. Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, pomoc a cenný čas, ktorý mi venoval. Ďalej by som sa chcel poďakovať Ing. Vendule Chatrnej za jej trpezlivosť, pomoc pri práci v laboratóriu a za jej rady pri spracovaní práce. Taktiež by som rád poďakoval svojej rodine a najbližším, ktorí ma podporovali počas štúdia.

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| 1. ÚVOD | 9 |
| 2. TEORETICKÁ ČASŤ | 10 |
| 2.1. Kyselina ferulová..... | 10 |
| 2.1.1. Výskyt a biologická funkcia kyseliny ferulovej | 10 |
| 2.1.2. Vlastnosti kyseliny ferulovej | 12 |
| 2.1.3. Izolácia kyseliny ferulovej z rastlinných materiálov | 13 |
| 2.1.4. Biosyntéza kyseliny ferulovej u rastlín | 15 |
| 2.2. Všeobecné cesty pre mikrobiálnu transformáciu kyseliny ferulovej..... | 16 |
| 2.2.1. Neoxidačná dekarboxylácia..... | 17 |
| 2.2.2. Redukcia postranného reťazca..... | 17 |
| 2.2.3. Diacetylácia | 18 |
| 2.2.4. Dimetylácia..... | 18 |
| 2.2.5. β -oxidácia | 18 |
| 2.3. Mediátory používané pre biotransformáciu kyseliny ferulovej..... | 19 |
| 2.3.1. Transformácia sprostredkovaná tkanivovou kultúrou | 19 |
| 2.3.2. Transformácia sprostredkovaná mikroorganizmami | 20 |
| 2.3.3. Baktérie rodu <i>Cupriavidus</i> | 20 |
| 2.3.4. Baktérie rodu <i>Halomonas</i> | 20 |
| 2.3.5. Termofilné baktérie | 21 |
| 2.4. Senzoricky aktívne látky získané biotransformáciou kyseliny ferulovej | 21 |
| 2.4.1. Vanillylalkohol | 21 |
| 2.4.2. Kyselina vanilová | 22 |
| 2.4.3. Vanilín | 23 |
| 2.4.4. 4-vinylguaiacol | 24 |
| 2.5. Súčasný výskum | 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 experimentálnej práce | 27 |
| 3.2.1. Kultivácia baktérii <i>Cupriavidus necator</i> H16 a <i>Cupriavidus maleysiensis</i> | 27 |
| 3.2.2. Kultivácia baktérii <i>Halomonas halophila</i> , <i>H. organivorans</i> , <i>H. elongata</i> , <i>H. neptunia</i> a <i>H. hydrothermalis</i> | 28 |
| 3.2.3. Kultivácia baktérii <i>Schlegelella thermodepolymerans</i> , <i>Tepidimonas taiwanensis</i> a <i>Rubrobacter xylanophilus</i> | 28 |
| 3.2.4. Rozsuspendovanie buniek do čerstvého média s obsahom kyseliny ferulovej .. | 29 |
| 3.2.5. Meranie optickej hustoty a pH | 29 |
| 3.2.6. Spektrofotometrické stanovenie celkových fenolových látok..... | 29 |
| 3.2.7. Kalibrácia na HPLC | 29 |
| 3.2.8. Kvalitatívna a kvantitatívna analýza na HPLC | 31 |
| 3.2.9. Porovnanie proteínovej sekvencie enzýmov baktérii podieľajúcich sa na biotransformácii kyseliny ferulovej pomocou vyhľadávacieho nástroja BLAST | 31 |
| 4. VÝSLEDKY A DISKUSIA | 32 |
| 4.1. Namerané hodnoty optickej hustoty a pH | 32 |
| 4.2. Spektrofotometrické stanovenie celkových fenolových látok..... | 33 |
| 4.3. Kvalitatívna a kvantitatívna analýza na HPLC..... | 35 |
| 4.3.1. Vzorky s baktériami rodu <i>Cupriavidus</i> | 35 |
| 4.3.2. Vzorky s baktériami rodu <i>Halomonas</i> | 36 |
| 4.3.2. Vzorky s termofilnými baktériami | 37 |
| 4.4. Porovnanie proteínovej sekvencie enzýmov baktérii podieľajúcich sa na biotransformácii kyseliny ferulovej pomocou vyhľadávacieho nástroja BLAST | 38 |
| 4.4.1. Feruloyl-CoA syntetáza..... | 38 |
| 4.4.2. Enoyl-CoA hydratáza/izomeráza..... | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4.3. β -ketothioláza (acetoacetyl-CoA thioláza)..... | 40 |
| 4.4.4. Vanilín dehydrogenáza | 40 |
| 4.4.5. Dekarboxyláza kyseliny ferulovej | 41 |
| 4.4.6. O-dimetyláza | 42 |
| 5. ZÁVER..... | 43 |
| 6. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY | 45 |

1. ÚVOD

Každý rok vzniká veľké množstvo lignocelulóзовých odpadov spracovaním vstupných surovín v potravinárskom a biotechnologickom priemysle a v ďalších najmä poľnohospodárskych procesoch, ktoré spôsobujú problémy so znečistením životného prostredia spaľovaním týchto odpadov na povrchu pôdy alebo ich začlenením do pôdnej matrice. Po celom svete sa vyrába široká škála zdrojov biomasy vrátane celých rastlín, častí rastlín (napr. semien, koreňov, stoniek) alebo zložiek rastlín (napr. škrob, lipidy, bielkoviny a vlákna) a vedľajších produktov spracovania (liehovarnícke výpalky).

Kyselina ferulová, jedna z významných fenolových kyselín, je súčasťou väčšiny rastlín a vo väčšej miere zastupuje zloženie lignocelulóзовých materiálov. Kyselina ferulová vykazuje silné antioxidačné vlastnosti, ktoré uplatňuje v bunkových stenách rastlín najmä ako ochranu pred voľnými radikálmi, ktoré spôsobujú oxidáciu, starnutie a mutáciu buniek. Okrem týchto výnimočných vlastností patrí kyselina ferulová k vhodným kandidátom na jej biotransformáciu na iné cenné molekuly. Jedná sa najmä o senzorycky aktívne látky, ktoré sa používajú hlavne v potravinárskom a kozmetickom priemysle. Z chemického hľadiska sú to napríklad alkoholy (nenasýtené, aromatické, heterocyklické, terpénové), karbonylové zlúčeniny a karboxylové kyseliny. Senzorycky aktívne látky nesú organoleptické vlastnosti a delia sa na látky vonné, chuťové, farebné (farbivá) a látky ovplyvňujúce textúru. Človek ich teda vníma svojimi zmyslami ako chuť, vôňu a farbu. Senzorycky aktívne látky sú preto veľmi dôležitou súčasťou potravín a kozmetických prípravkov, ktorým dodávajú požadované vlastnosti.

Vzhľadom na veľký dopyt po senzorycky aktívne látky v potravinárskom a aj kozmetickom priemysle dochádza k snahe získavať tieto látky čo najvýhodnejším spôsobom a to z hľadiska ekologického aj ekonomického. Veľmi dobrým potenciálnym zdrojom kyseliny ferulovej sú spomínané lignocelulóзовé materiály, ktoré sú vo svete dostupné v hojnom množstve a obsahujú dostatočné množstvo kyseliny ferulovej na jej biotransformáciu. Vďaka podobnej chemickej štruktúre kyseliny ferulovej ku karbonylovým senzorycky aktívnym zlúčeninám (napríklad vanilín) je táto biotransformácia možná. Na transformáciu kyseliny ferulovej sa používajú hlavne mikroorganizmy, ktoré využívajú kyselinu ferulovú ako jediný zdroj uhlíka a energie.

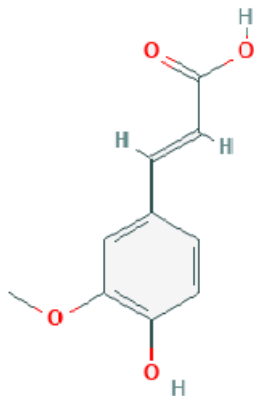
Táto práca je založená na screeningu biotransformačného potenciálu baktérii *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus malaysiensis*, baktérii rodu *Halomonas*: *H. halophila*, *H. organivorans*, *H. elongata*, *H. neptunia*, *H. hydrothermalis* a termofilných baktérii *Schlegelella thermodepolymerans*, *Tepidimonas taiwanensis*, *Rubrobacter xylanophilus* a tým posúdiť, aké výhody by mohli priniesť tieto mikroorganizmy v priemysle pri výrobe senzorycky aktívnych látok.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1. Kyselina ferulová

Kyselina ferulová (kyselina 4-hydroxy-3-metoxyškoricová) je silný antioxidant prítomný v bunkových stenách zŕn, ovocia a zeleniny, kde je konjugovaná s polysacharidmi a inými zlúčeninami. Kyselina ferulová, ako taktiež napríklad kyselina kávová, p-kumarová, synapín, syryt, a vanilová kyselina je najbežnejším derivátom kyseliny hydroxyškoricovej [1].

V rastlinách dochádza k tvorbe kyseliny ferulovej pomocou tzv. šikimatovej dráhy, ktorá začína aminokyselinami fenylalanínom a tyrozínom. Chemická štruktúra kyseliny ferulovej podobne ako štruktúra fenylalanínu a tyrozínu pozostáva z deväť uhlíkových skeletov (C₆C₃) s dvojnou väzbou s postranným reťazcom (s *cis* alebo *trans* konfiguráciou), ktoré predstavujú fenylpropanoidnú štruktúru. Hydroxylové funkčné skupiny na benzénovom kruhu a nenasýtená väzba jeho etylénového postranného reťazca sú dôležitými miestami pre reakcie s reaktívnymi druhmi kyslíka (ROS), ktoré znázorňujú vzťah medzi štruktúrou a aktivitou. Jej biologická aktivita teda závisí od spôsobu substitúcie aromatickej skupiny [2].



Obrázok 1: Štruktúrny vzorec kyseliny ferulovej [3]

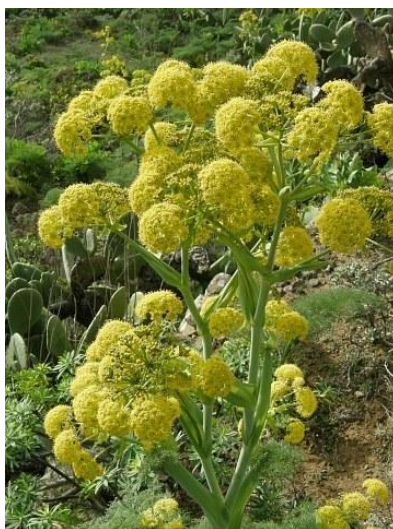
2.1.1. Výskyt a biologická funkcia kyseliny ferulovej

Kyselina ferulová sa nachádza prakticky vo všetkých rastlinách (ovocie, zelenina, obilie). Väčšina týchto derivátov je viazaná cez esterovú, etherovú alebo acetátovú väzbu k určitej časti rastliny, napríklad k oligosacharidom. Veľmi dobrým zdrojom kyseliny ferulovej sú napríklad pšeničné otruby (Obrázok 2). Jedná sa o lignocelulózový materiál zložený z lignínu, celulózy a hemicelulózy. Keďže je kyselina ferulová bifunkčná, je schopná tvoriť esterové alebo éterové väzby na tieto komponenty rastlín reakciou svojich karboxylových alebo fenolových skupín. Kyselina ferulová, ako zložka primárnej a sekundárnej bunkovej steny, sa v sekundárnej bunkovej stene viaže esterovými väzbami na štruktúrne polysacharidy, zatiaľ čo diméry kyseliny ferulovej môžu slúžiť na zosieťovanie hemicelulózy [4, 5].



Obrázok 2: Pšeničné otruby [6]

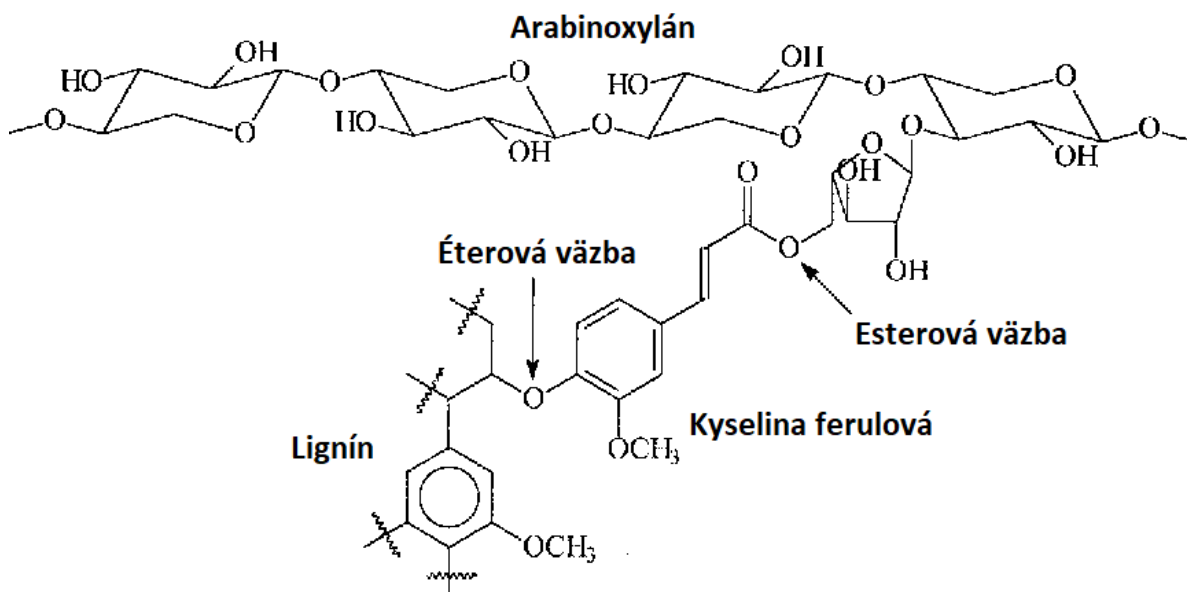
Kyselina ferulová bola po prvýkrát identifikovaná ako zložka rastliny *Ferula foetida* (čel'ad' *Umbelliferae*) (Obrázok 3), od ktorej je odvodený jej názov. Funguje pri zosieťovaní bunkových stien rastlín a je tiež prekursorom rôznych antimikrobiálnych zlúčenín, signálnych molekúl a fytoalexínov, ktoré hrajú dôležitú úlohu v obranných reakciách rastlín. Je tiež jednou z bežne uvádzaných antioxidačných zlúčenín [7, 8].



Obrázok 3: *Ferula foetida* [9]

Kyselina ferulová je prítomná v relatívne vysokých koncentráciách v bunkových stenách niekoľkých rastlín vrátane *Graminaceae* medzi jednoklíčnolistovými rastlinami a *Solanaceae* a *Chenopodiaceae* medzi dvojklíčnolistovými rastlinami. Kyselina ferulová sa nachádza kovalentne spojená s polysacharidmi esterovými väzbami a so zložkami lignínu éterovými alebo esterovými väzbami (Obrázok 4). Zistilo sa, že dodáva štruktúrnu rigiditu a posilňuje architektúru bunkových stien zosieťovaním pentosanových reťazcov, arabinoxylánov a

hemicelulóz, čím sa tieto komponenty počas klíčenia stávajú menej náchylnými na štiepenie hydrolytickými enzýmami [7, 8].



Obrázok 4: Väzba kyseliny ferulovej na lignín a arabinoxylán ako hlavná zložka hemicelulózy [10]

2.1.2. Vlastnosti kyseliny ferulovej

Kyselina ferulová má nízku toxicitu a má mnoho fyziologických funkcií (protizápalová, antioxidačná, antimikrobiálna aktivita; protinádorový a antidiabetický účinok) a preto sú jej vlastnosti využívané vo farmaceutickom, potravinárskom a kozmetickom priemysle. Kyselina ferulová je lapačom voľných radikálov, ale je tiež inhibítor enzýmov, ktoré katalyzujú tvorbu voľných radikálov. Kyselina ferulová má ochrannú úlohu pre hlavné kožné štruktúry ako sú keratinocyty, fibroblasty, kolagén, elastín. Inhibuje melanogenézu, zvyšuje angiogenézu a urýchľuje hojenie rán. Ochranné vlastnosti kyseliny ferulovej sa aplikujú v kozmetickom priemysle ako fotoprotektívne činidlo, na oneskorenie procesov starnutia pokožky a tiež ako zosvetľujúca zložka. Jej použitie je napriek tomu obmedzené jej tendenciou k rýchlej oxidácii [11].

2.1.2.1. Antioxidačné vlastnosti kyseliny ferulovej

Antioxidačný mechanizmus pôsobenia kyseliny ferulovej je komplexný, založený hlavne na inhibícii tvorby reaktívnych foriem kyslíka (ROS) alebo dusíka, ale aj na neutralizácii voľných radikálov – viazaním prechodných kovov, ako je železo a meď. Kyselina ferulová má antioxidačné vlastnosti vďaka svojej štruktúre, konkrétne fenolovej hydroxylovej skupine. Elektróny donorovej skupiny na benzénovom kruhu kyseliny ferulovej zabezpečujú ukončenie reťazových reakcií radikálov a prítomnosť karboxylovej skupiny susednou nenasýtenou dvojnou väzbou C-C môže poskytnúť ďalšie miesto na napadnutie voľnými radikálmi a zabrániť im tak napadnutiu bunkovej membrány. Okrem toho, karboxylové skupiny kyseliny ferulovej poskytujú určitú ochranu pred peroxidáciou lipidov a preto sa niekedy kyselina

ferulová používa ako aditívum do potravín. Z toho je zrejmé, že prítomnosťou elektrón donorových substituentov sa zvyšujú antioxidačné vlastnosti kyseliny ferulovej [11, 12].

2.1.2.2. Antioxidant proti nepriaznivému vplyvu UV žiarenia

Nadmerným vystavením pokožky ultrafialovému (UV) žiareniu vedie k tvorbe reaktívnych foriem kyslíka/dusíka, čo vedie k oxidačnému poškodeniu buniek. ROS poškadzujú bunky procesom peroxidácie lipidov, nitrácie aminokyselín a dokonca spôsobujú zmeny DNA, ktoré vedú k bunkovej smrti. Kyselina ferulová vykazuje ochranné antioxidačné vlastnosti vo vzťahu k rôznym kožným štruktúram a ku kožným bunkám. Bolo dokázané, že ľudské endotelové bunky a keratinocyty sú oveľa menej náchylné na poškodenie voľnými radikálmi vyvolanými UV žiarením, keď sú pred ožiarení vystavené pôsobením kyseliny ferulovej a preto sa používa v antiagingových kozmetických prípravkoch [11, 12].

2.1.2.3. Antioxidant proti škodlivým účinkom rádioterapie

Rádioterapia je forma liečby rakoviny pri ktorej pôsobením ionizujúceho žiarenia dochádza k usmrteniu rakovinových buniek a zmenšeniu nádorov. Nevýhodou tejto liečby je to, že dochádza aj k poškodeniu alebo zničeniu normálnych buniek, čo znemožňuje ich ďalšiu rast a delenie. Škodlivé účinky ionizujúceho žiarenia v biologických systémoch sú sprostredkované hlavne generáciou ROS vrátane superoxidového aniónu, hydroxylového radikálu a peroxidu vodíka. Je známe, že tieto ROS spôsobujú oxidačný stres v niekoľkých kritických bunkových molekulách, ako sú DNA, proteíny a lipidové membrány. Bolo zaznamenané, že predbežným použitím kyseliny ferulovej na γ -ožiarené lymfocyty viedlo k zníženiu peroxidácie lipidov a zlepšeniu antioxidačného stavu zabraňujúcemu poškodeniu lymfocytov. Aplikáciou kyseliny ferulovej sa zabraňuje tvorbe ROS a taktiež vychytáva aniónový radikál superoxidu a inhibuje peroxidáciu lipidov indukovanú superoxidom [12].

2.1.3. Izolácia kyseliny ferulovej z rastlinných materiálov

Existujú dve metódy, ktoré môžu prerušiť zosieťovanie pentosanových reťazcov, arabinoxylánov a hemicelulóz, a tak uvoľniť kyselinu ferulovú z bunkových stien rastlín. Kyselina ferulová môže byť uvoľnená buď enzymaticky za použitia feruloylesteráz, alebo chemickou hydrolýzou za použitia zásad alebo kyselín pri zvýšenej teplote [13].

2.1.3.1. Izolácia chemickou hydrolýzou

Chemická hydrolýza je dobre známa technika používaná na získanie celulózovej frakcie lignocelulózových materiálov v tuhej fáze. Touto hydrolýzou je možné modifikovať konzistenciu celulózovej štruktúry, a tým ju sprístupniť pre enzýmy, ktoré sú schopné ďalej rozložiť celulózu. Súčasne sa rozpúšťajú fenolové zlúčeniny prítomné v lignínovej frakcii lignocelulózu. Rastlinné bunkové steny môžu byť vystavené extrémnym hodnotám pH, aby boli prerušené určité väzby v bunkovej stene. Alkalickým spracovaním sa preruší esterová väzba spájajúca fenolové kyseliny s bunkovou stenou. Použitím kyseliny sa rozbijú glykozidické väzby a rozpustí sa cukor, zatiaľ čo esterové väzby spravidla zostanú neporušené [8, 15].

Ako katalyzátory pre alkalickú hydrolýzu sa používajú zásady ako napríklad NaOH, Ca(OH)₂, NH₄OH a H₂O₂. Hydroxid sodný je v porovnaní s ostatnými činidlami selektívnejší

pri uvoľňovaní kyseliny ferulovej vďaka nízkemu delignifikačnému výnosu. Alkalickými predúpravami dochádza k rozpusteniu lignínu pomocou rozrušenia esterových väzieb z komplexu lignín-polysacharid. Zároveň dochádza k uvoľneniu fenolových kyselín [5, 13].

Najbežnejšími kyselinami pre kyslú hydrolýzu je kyselina chlorovodíková a kyselina sírová. Po použití kyselín a následnej premene celulózy a hemicelulózy na monosacharidy zostáva lignín ako zvyškový produkt. Následne sa tieto monosacharidy dajú ďalej využiť na produkciu biopalív, PHA a podobných užitočných produktov [14].

Tieto chemické úpravy si však niekedy vyžadujú vysoké koncentrácie kyseliny alebo zásady a vysokú teplotu na povznesenie celulózy a to vedie k degradácii významnej časti týchto zlúčenín. Chemická hydrolýza navyše zahŕňa aplikáciu kyseliny alebo zásady v koncentrovanej forme, čo spôsobuje problémy s koróziou a vysoké náklady na zariadenie spojené s týmito procesmi, čím sa obmedzuje jej široká použiteľnosť. Ešte väčším nežiadúcim účinkom je fakt, že kyselina ferulová a ďalšie fenolové kyseliny patria medzi mikrobiálne inhibítory, ktoré znižujú efektívnosť fermentačného procesu. Ďalšou nevýhodou chemickej hydrolýzy je možnosť vzniku toxických produktov (polyfenoly, octová kyselina, furfural), ktoré taktiež znižujú efektívnosť fermentácie. Preto je niekedy potrebné použiť miernejšie podmienky na optimalizáciu uvoľňovania esterovo viazaných fenolových kyselín pre možnú biotransformáciu na senzoryicky aktívne látky ako napríklad vanilín. Vhodnejšou a špecifickejšou metódou je enzymatická hydrolýza [5, 8].

2.1.3.2. Izolácia enzymatickou hydrolýzou

Enzymatická hydrolýza materiálov prebieha vďaka synergickému spojeniu enzýmov, ktoré degradujú arabinoxylány, konkrétne xylanázy. Tie degradujú lineárny polysacharid xylán na xylózu, a tým rozkladajú hemicelulózu. Spolu s týmito synergickými enzýmami pracujú esterázy kyseliny ferulovej [15].

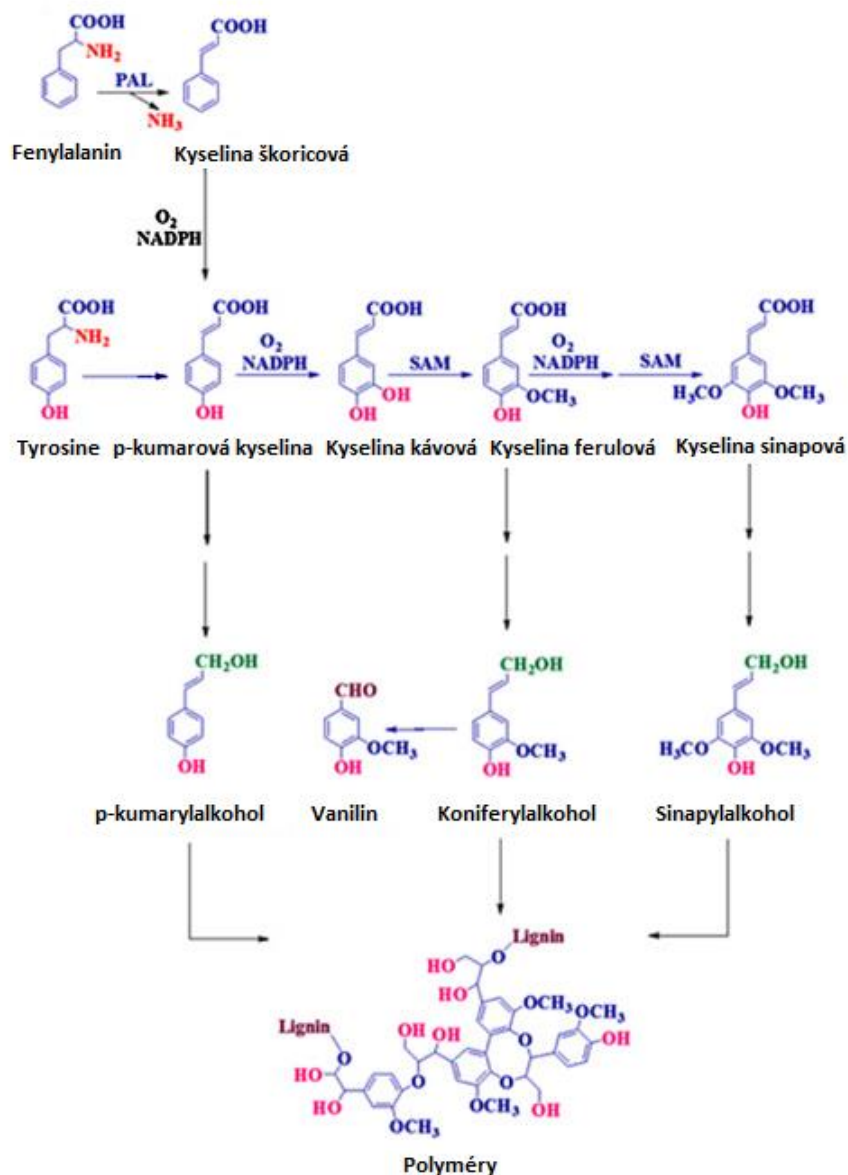
Feruloylesterázy sú podtriedou esteráz karboxylových kyselín a sú schopné hydrolyzovať esterifikované fenolové kyseliny z bunkových stien rastlín. Feruloylesterázy sú enzýmy zodpovedné za štiepenie esterovej väzby medzi polysacharidmi a monomérou alebo dimérou kyselinou ferulovou. Táto enzymová aktivita uvoľňuje kyselinu ferulovú a jej diméry z prirodzene sa vyskytujúcich hemicelulóz a pektínov [16, 17].

Feruloylesterázy tvoria heterogénnu skupinu enzýmov pričom distribúcia rôznych podskupín feruloylesterázy vo svete húb sa výrazne líši. Ako príklad môžu byť feruloylesterázy z *Aspergillus niger*. Pôsobia synergicky s xylanázami, aby uvoľňovali kyselinu ferulovú z bunkovej steny a možno ich rozdeliť do štyroch skupín, a to A – D. Hlavným rozdielom medzi skupinami A a D je ich substrátová špecifickosť voči syntetickým substrátom a ich schopnosť uvoľňovať diferuloxylové mostíky. Aj keď oba enzýmy typu A a B pôsobia na xylán a pektín, aktivita feruloylesterázy A je najvyššia na xyláne a aktivita feruloylesterázy B je najvyššia na pektíne. Líšia sa tiež vzhľadom na zvyšok, z ktorého môžu uvoľňovať kyselinu ferulovú. Použitím metylesterov aromatických kyselín sa ukázalo, že prítomnosť metoxyskupiny na aromatickom kruhu uprednostňuje aktivitu feruloylesterázy A, zatiaľ čo prítomnosť hydroxylových skupín uprednostňuje aktivitu feruloylesterázy B. Feruloylesterázy typu B taktiež vykazujú vysokú sekvenčnú identitu s acetylovo xylánovými esterázami. Na základe tohto by sa feruloylesterázy dali klasifikovať do siedmich skupín v závislosti od fylogenetickej

analýzy genómov húb, a však experimentálne je možné dokázať aj iný počet podčeľadí [18, 19].

2.1.4. Biosyntéza kyseliny ferulovej u rastlín

K tvorbe kyseliny ferulovej v rastlinách dochádza metabolickou dráhou tzv. šikimatovho dráhou, ktorá začína kľúčovými zlúčeninami, ktorými sú aromatické aminokyseliny, L-fenylalanín a L-tyrozín. Spočiatku sa fenylalanín premieňa na kyselinu škoricovú pomocou fenylalanín amónnej lyázy. Následne sa tyrozín premieňa na kyselinu *p*-kumarovú pomocou tyrozín amónnej lyázy. Kyselina *p*-kumarová sa premení na kyselinu ferulovú hydroxyláciou a metyláciou. Oxidáciou a metyláciou kyseliny ferulovej a ďalších aromatických zlúčenín sa získajú di- a tri-hydroxyderiváty kyseliny škoricovej, ktoré sa spolu s kyselinou ferulovou zúčastňujú na tvorbe lignínu. Ďalšie konverzné reakcie sa vyskytujú počas tvorby kyseliny ferulovej a ďalších aromatických zlúčenín, ktoré sú schematicky znázornené na Obrázku 5 [20].



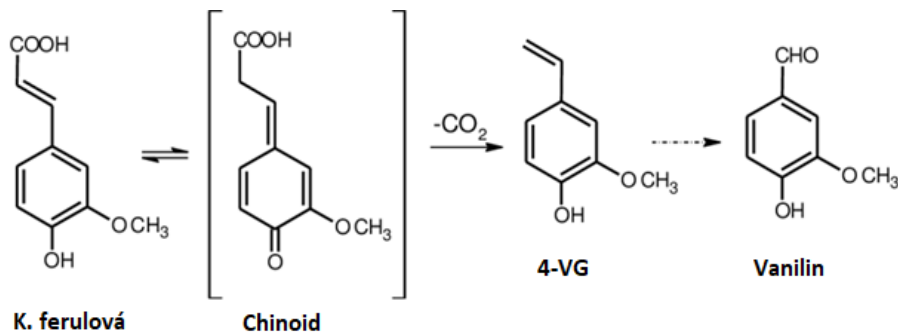
Obrázok 5: Schematické znázornenie syntézy kyseliny ferulovej a iných aromatických zlúčenín cez šikimateho dráhu (PAL: fenylalanín amónna lyáza; TAL: tyrozín amónna lyáza; SAM: S-adenosylmetionín (pôsobí ako metylový donor)) [20]

2.2. Všeobecné cesty pre mikrobiálnu transformáciu kyseliny ferulovej

Pokiaľ ide o počiatočnú reakciu pri konverzii kyseliny ferulovej, je známych päť hlavných ciest, a to neoxidačná dekarboxylácia, redukcia postranného reťazca, diacetylácia, dimetylácia a β -oxidácia [7].

2.2.1. Neoxidačná dekarboxylácia

Pri neoxidačnej dekarboxylácii katalyzovanej enzýmom dekarboxylázy sa kyselina ferulová konvertuje na 4-vinylguaiakol (4-VG) a na vanilín cez chinoidový medziprodukt (Obrázok 6). Tento typ dráhy bol pozorovaný v mnohých hubách a kvasinkách a tiež v niektorých baktériách [7, 21].

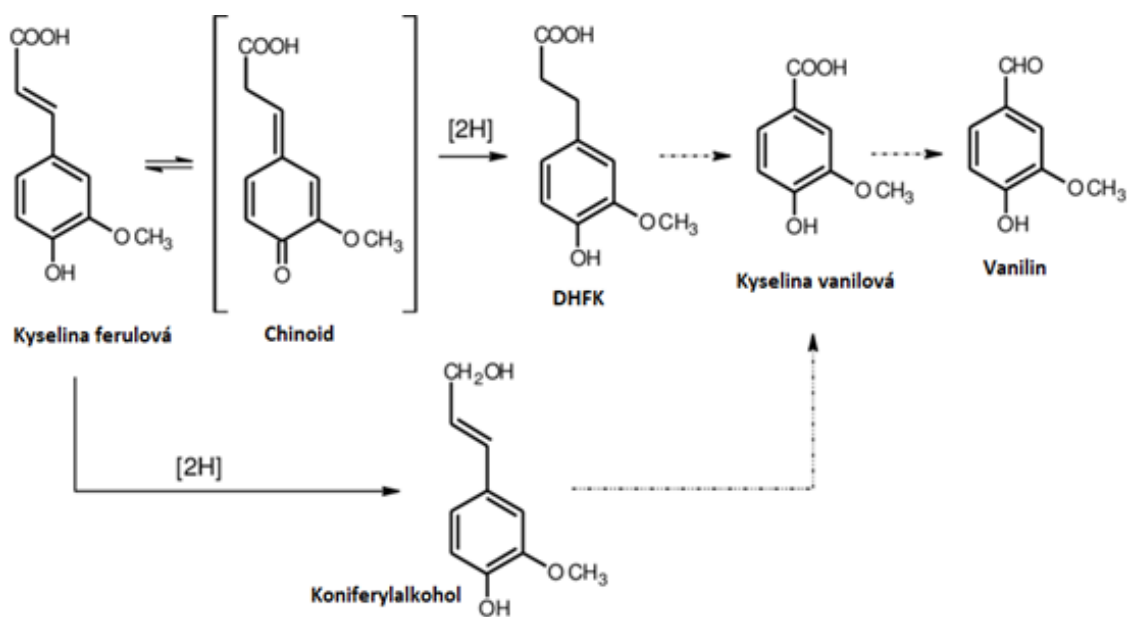


Obrázok 6: Konverzia kyseliny ferulovej na vanilín neoxidačnou dekarboxylačnou cestou [21]

2.2.2. Redukcia postranného reťazca

Druhý mechanizmus spočíva v prvom rade v redukcii bočného reťazca kyseliny ferulovej za vzniku kyseliny 4-hydroxy-3-metoxyfenylpropiónovej (dihydroferulová kyselina, DHFK). Táto reakcia je typická pre anaeróbnú degradáciu a jeho zodpovedajúci mechanizmus by prebiehal prostredníctvom hydridového útoku na chinoidový medziprodukt iniciovaný izomerizáciou analogickou k dekarboxylačnej reakcii (Obrázok 7) [21].

Je zaujímavé, že pre niektoré huby, ako napríklad *Trametes* sp., *Sporotrichum pulverulentum* a *Pycnoporus cinnabarinus* sa uvádza odlišný redukčný mechanizmus, v ktorom je produkovaný prvý koniferylalkohol, ktorý je následne biotransformovaný na kyselinu vanilovú a ďalšie deriváty. To stojí brať na vedomie, že v mikroorganizmoch, ktoré sú tiež schopné dekarboxylácie kyseliny ferulovej, sa zdá, že reduktívna dráha je potlačená prítomnosťou akceptorov vodíka, ako je dusičnan, fumarát alebo kyslík [21].



Obrázok 7: Konverzia kyseliny ferulovej na vanilín cestou redukcie bočného reťazca [21]

2.2.3. Diacetylácia

Eliminácia acetátovej skupiny z nenasýteného škoricového postranného reťazca je jednou z najbežnejších metabolických ciest kyseliny ferulovej v baktériách a hubách. Navrhovaná cesta štiepenia acetátu z kyseliny ferulovej zahŕňa prídanie vody k dvojitej väzbe za vzniku hydroxyderivátu, ktorý následne podstúpi oxidácii na ketónovú formu a nakoniec dochádza k odstránení acetátovej skupiny za vzniku vanilínu [7].

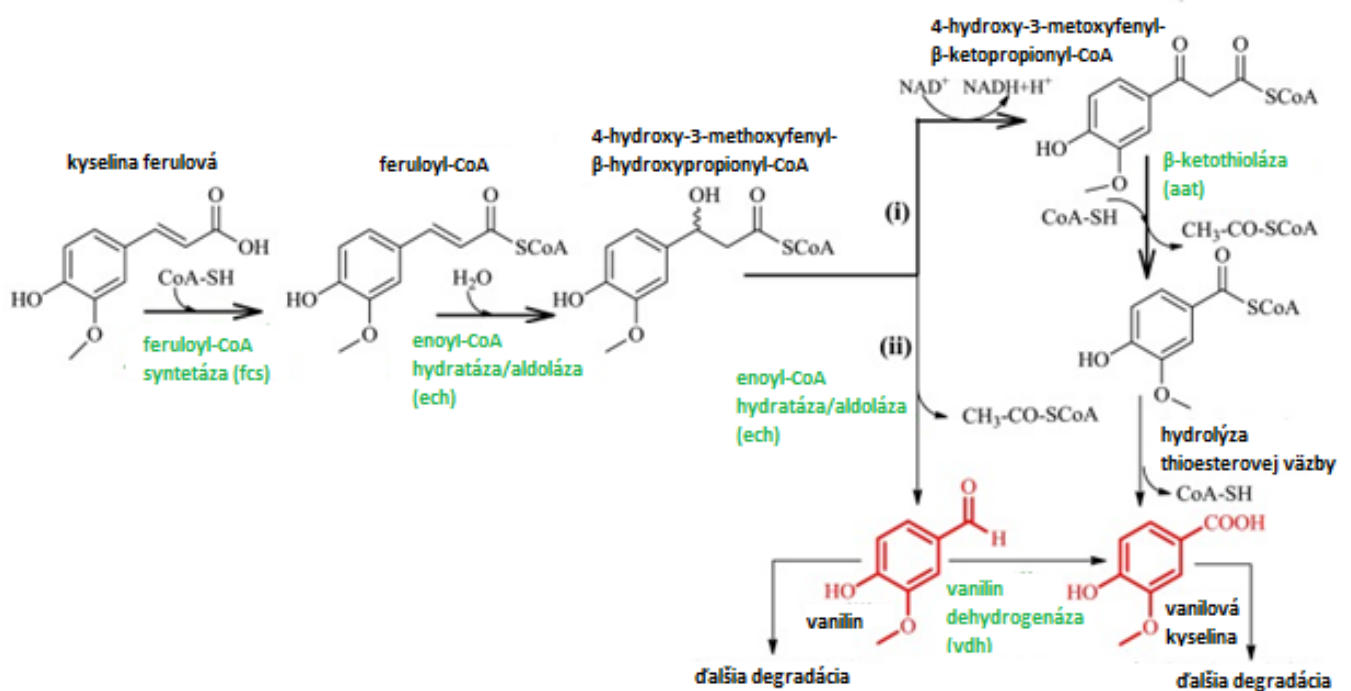
2.2.4. Dimetylácia

Anaeróbne baktérie *Clostridium metoxybenzovorans* a fakultatívne aeróbne baktérie *Enterobacter cloacae* preukázali, že rastú na kyseline ferulovej a transformujú ju na kyselinu kávovú. Tieto kmene pravdepodobne použili rôzne enzymatické dráhy pre O-dimetyláciu kyseliny ferulovej na kyselinu kávovú. Základnou enzymatickou dráhou pre O-dimetyláciu kyseliny ferulovej je konverzia kyseliny kávovej na kyselinu protokatechovú, po ktorej nasleduje ďalšie štiepenie aromatického kruhu. Pri anaeróbnom metabolizme dochádza k premene kyseliny kávovej dehydroxyláciou aromatického kruhu na kyselinu škoricovú. Kyselina škoricová je potom redukovaná na kyselinu fenyylpropiónovú, ktorá je následne metabolizovaná na kyselinu fenyloctovú. Pri aeróbnom metabolizme je kyselina kávová oxidovaná na kyselinu protokatechovú. V kultivačnom médiu sa objavila kyselina kávová ako medziprodukt alebo ako konečný produkt. Kyselina kávová získaná mikrobiálnou dimetyláciou kyseliny ferulovej by sa mohla používať na produkciu veľmi dobrých prírodných antioxidantov [7, 17].

2.2.5. β -oxidácia

Jednou z ďalších ciest zapojených do premeny kyseliny ferulovej na kyselinu vanilovú alebo vanilín v mikroorganizmoch je proces β -oxidácie, ku ktorému dochádza mechanizmom

analogickým s β -oxidáciou mastných kyselín. Kyselina ferulová sa aktivuje reakciou s CoA thioesterom pomocou feruloyl-CoA syntetázy (kódovanej génmi fcs) na feruloyl-CoA, ktorý je následne hydratovaný na nestabilný produkt 4-hydroxy-3-metoxyfenyl- β -hydroxypropionyl-CoA pomocou enoyl-CoA hydratázy/aldolázy (kódovanej génmi ech). Prvá cesta zahŕňa thioklastické štiepenie 4-hydroxy-3-metoxyfenyl- β -ketopropionyl-CoA na acetyl-CoA a vanillyl-CoA, katalyzované β -ketotiólázou (kódovanou aat génmi) (Obrázok 8, cesta (i)). Druhou cestou degradácie kyseliny ferulovej v mikroorganizmoch je mechanizmus, pri ktorom sa po hydratácii feruloyl-CoA 4-hydroxy-3-metoxyfenyl- β -hydroxypropionyl-CoA štiepi na vanilín a acetyl-CoA (Obrázok 8, cesta (ii)). Obe reakcie sú teda katalyzované jedným enzýmom enoyl-CoA hydratáza/aldoláza (kódovaná génmi ech) [22].



Obrázok 8: Enzymatická premena kyseliny ferulovej na vanilín a kyselinu vanilovú. Tenké šípky označujú β -oxidačnú dráhu. Tučné šípky označujú β -neoxidačnú degradáciu [22].

2.3. Mediátory používané pre biotransformáciu kyseliny ferulovej

Na biotransformáciu kyseliny ferulovej sú nutné určité organizmy alebo ich bunky. Transformácia kyseliny ferulovej môže prebiehať prostredníctvom rastlinnej tkanivovej kultúry alebo mikrobiálnou cestou [7].

2.3.1. Transformácia sprostredkovaná tkanivovou kultúrou

Dôvodom výroby senzorycky aktívnych zlúčenín pomocou kultivovaných rastlinných buniek je ich špecifický biochemický charakter, genetická kapacita a totipotencia rastlinných buniek. Nevýhodou je ale to, že rastlinné systémy produkujú obmedzenejší rozsah enzýmov a nediferencované rastlinné bunky vyžadujú v porovnaní s mikrobiálnymi bunkami dlhšiu dobu zdvojnásobenia buniek [7, 23].

2.3.2. Transformácia sprostredkovaná mikroorganizmami

Mikroorganizmy sú oproti rastlinám vhodnejšími kandidátmi na vykonávanie biotransformácie, pretože môžu využívať fenolové zlúčeniny ako jediný zdroj uhlíka a energie. Imobilizácia mikrobiálnych buniek má vo výskume veľký potenciál a to z hľadiska viacerých faktorov ako napríklad ich vynikajúca biologická kompatibilita, vysoká koncentrácia buniek, skladovacia a prevádzková stabilita a tolerancia voči nepriaznivým podmienkam (vysoká alebo nízka teplota, suché prostredie, UV žiarenie, nízke pH, toxické látky). Hlavnými mikroorganizmami schopnými degradovať zlúčeniny spojené s lignínom sú vláknité huby. Mikroriasy sa tiež čoraz viac používajú v biotransformáciách, ktoré vedú k vzniku vonných látok. Napriek výhodným vlastnostiam mikroorganizmov sa ale môže stať aj to, že výtťažok produktu môže byť nízky kvôli inhibičnému účinku produktu na voľné mikrobiálne bunky alebo kvôli genetickej nestabilite rekombinantných kmeňov počas transformácie. Taktiež, samotná mikrobiálna kultúra a náročná manipulácia s mikroorganizmami môže viesť k vysokým nákladom na samotný proces biotransformácie za použitia voľných mikroorganizmov. Na druhú stranu napríklad využitie termofilných mikroorganizmov prináša výrazne menej náchylné procesy na kontamináciu a tým pádom nižšie nároky [7, 24, 25].

2.3.3. Baktérie rodu *Cupriavidus*

V tejto bakalárskej práci boli na biotransformáciu kyseliny ferulovej použité baktérie *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus malaysiensis*. Baktérie rodu *Cupriavidus* sú charakterizované ako gramnegatívne, pohyblivé organizmy v tvare tyčinky s oxidačným metabolizmom. Majú peritrichálne bičíky, sú obligátne aeróbne organizmy a sú chemoorganotrofné alebo chemolitotrofné. U baktérii rodu *Cupriavidus* bola opísaná odolnosť voči medi, od čoho bol odvodený názov týchto baktérii. Tieto baktérie sa našli v pôde ale aj v klinických izolátoch po zdravotníckych vyšetrení. Baktérie rodu *Cupriavidus* rastú na rutinných médiách, aj keď rast môže byť pomalý a na vizualizáciu kolónií sa vyžaduje viac ako 72 hodín inkubácie. Rod baktérii *Cupriavidus* je schopný využiť širokú škálu aromatických zlúčenín, ktoré sú produkty degradácie lignínu ako jediný zdroj uhlíka a energie, vrátane guaiakolu, kyseliny vanilovej, kyseliny škoricovej, kyseliny p-kumarovej a kyseliny ferulovej [26, 27, 28].

2.3.4. Baktérie rodu *Halomonas*

Ďalšími baktériami použitými na transformáciu kyseliny ferulovej boli baktérie rodu *Halomonas* a konkrétne to boli: *H. halophila*, *H. organivorans*, *H. elongata*, *H. neptunia* a *H. hydrothermalis*. Baktérie rodu *Halomonas* sú halofilné baktérie, ktoré pre svoj rast vyžadujú vysoké koncentrácie NaCl. Majú veľmi univerzálne použitie, pokiaľ ide o ich schopnosť úspešne rásť v prostredí o rôznom pH. Baktérie rodu *Halomonas* sú gramnegatívne baktérie v tvare tyčinky, ktoré sú zvyčajne nepigmentované alebo majú žltú farbu. Sú to extrémne halofilné baktérie s plnou pohyblivosťou, ktorú zabezpečujú bičíky. Tieto baktérie sa teda vzhľadom na svoje halofilné vlastnosti vyskytujú vo vodných zdrojoch s vysokou úrovňou slanosti, ako napríklad v Mŕtvom mori, a dokonca aj v chladných vodách Antarktídy. Bez prítomnosti dusičnanov sú schopné anaeróbného rastu pomocou glukózy. Okrem toho bolo zdokumentovaných niekoľko druhov rodu *Halomonas*, ktoré sú schopné vykonávať denitrifikáciu s cieľom získať energiu spracovaním dusičnanov na dusík [29, 30, 31, 32].

2.3.5. Termofilné baktérie

Ako posledným druhom baktérii boli v tejto bakalárskej práci použité termofilné baktérie *Schlegelella thermodepolymerans*, *Tepidimonas taiwanensis* a *Rubrobacter xylanophilus*. Termofilné baktérie alebo termofily sú mikroorganizmy schopné rasti pri teplotách vyšších ako 40°C a majú optimálne podmienky na rast pri teplotách 50°C-55°C. Tieto baktérie sa vyskytujú v termálnych prameňoch (Obrázok 9), sopečných náleziskách a taktiež v rozkladajúcich sa látkach ako napríklad kompost. Termofily sa môžu ďalej deliť na extrémne termofily s optimálnou teplotou rastu 60-80°C a hypertermofily s optimálnou teplotou rastu 80-110°C. Ďalej sa delia na gram-pozitívne a gram-negatívne termofily, môžu rásť za anaeróbných alebo aeróbných podmienok a niektoré môžu tvoriť spóry. Významnou súčasťou týchto baktérii sú ich enzýmy pomocou ktorých je možné katalyzovať reakcie v priemysle pri zvýšených teplotách (napríklad pri výrobe palív a iných chemikálii). Výhodou reakcií pri zvýšenej teplote je nízka kontaminácia, väčšia rozpustnosť substrátov a tým nižšie náklady na výrobu [33, 34, 35, 36].



Obrázok 9: Termálne pramene na Novom Zélande ako nálezisko termofilných mikroorganizmov [37]

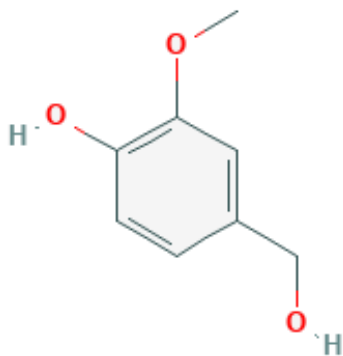
2.4. Senzoricky aktívne látky získané biotransformáciou kyseliny ferulovej

Kyselinu ferulovú je možné biotransformovať pomocou mikroorganizmov na rôzne významné sensoricky aktívne látky používané v priemysle. Môže to byť napríklad vanillylalkohol, kyselina vanilová, vanilín a 4-vinylguaiacol, ktoré boli sledované v tejto bakalárskej práci [7, 38, 40, 42, 44].

2.4.1. Vanillylalkohol

Vanillylalkohol (4-hydroxy-3-metoxybenzylalkohol) je monometoxybenzén, ktorý je 2-metoxyfenolom substituovaným hydroxymetylovou skupinou v polohe 4 (Obrázok 10). Vanillylalkohol, široko používaný aromatický prípravok, je prírodná fenolová zlúčenina, ktorá existuje v niekoľkých rozmanitých rastlinách, ako je napríklad *Gastrodia elata* a *Vanilla*

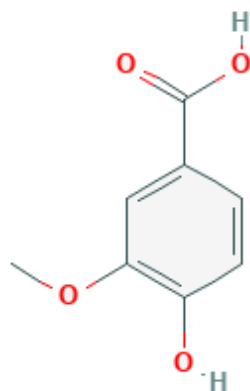
planifolia. Vanillylalkohol nesie rôzne biologické aktivity ako napríklad antioxidačné, antiangiogénne, protizápalové a antiastmatické aktivity. Okrem toho má vanillylalkohol antikonzulzívnu aktivitu a vycytáva voľné radikály. Hlavný prístup k výrobe vanillylalkoholu je priamou extrakciou z rastlín *Gastrodia elata* a *Vanilla planifolia*. Tieto prístupy sú však obmedzené prísunom surovín, nepriaznivými reakčnými podmienkami a nízkymi výnosmi. Riešením týchto obmedzení môže byť práve spomínaná alternatívna cesta - mikrobiálna biosyntéza ako výhodnejší prístup k výrobe vanillylalkoholu [38].



Obrázok 10: Štruktúrny vzorec vanillylalkoholu [39]

2.4.2. Kyselina vanilová

Kyselina vanilová je derivát kyseliny benzoovej, ktorý sa používa ako ochucovadlo, konzervačná látka a aditívum v potravinárskom priemysle. Kyselina vanilová je fenolová molekula, ktorá je oxidovanou molekulou vanilínu. Získava sa z celozrnných obilnín, bylín, ovocia, zeleného čaju, džúsov, pív a vín. Je známe, že má rôzne farmakologické vlastnosti ako napríklad antioxidačné, protizápalové, imunostimulačné, neuroprotektívne, hepatoprotektívne, kardioprotektívne a antiapoptotické. Kyselina vanilová je taktiež sľubné neuroprotektívne činidlo pri liečbe vaskulárnej demencie. Zohráva tiež významnú úlohu pri liečbe zápalov a neurologických chorôb. Vďaka svojim priaznivým vlastnostiam sa kyselina vanilová môže použiť ako zložka funkčných potravín a ako doplnok výživy na prevenciu neurologických porúch [40].



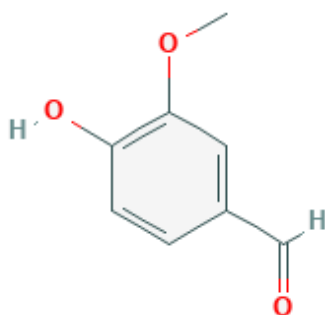
Obrázok 11: Štruktúrny vzorec kyseliny vanilovej [41]

2.4.3. Vanilín

Vanilín je hlavnou organoleptickou zlúčeninou prírodnej vanilky získanej z plodu orchidey *Vanilla planifolia*. Vanilín je jedna najžiadanejších potravinárskych prísad používaných aj v nápojoch, parfumoch a liečivách. Prírodná výroba z vanilkového zrna, okrem vysokých nákladov, nemôže uspokojiť celkový dopyt po vanilíne na svete. Ročne sa vyrába viac ako 12 000 ton vanilínu, z ktorého pochádza iba 1% z *V. planifolia*. Vzhľadom na zvýšený záujem o prírodné produkty, výroba aróm prostredníctvom biotransformačných procesov ponúka vhodnú alternatívu k prírodným a chemickým zdrojom [42].

Hlavnou nevýhodou mikrobiálnej výroby vanilínu je vysoká cena jej prvotnej suroviny, tj. kyseliny ferulovej. Alternatívna produkcia vanilínu zelenou cestou z drevnej štiepky a bambusu prostredníctvom bakteriálneho konzorcia je taktiež možnosť produkcie vanilínu prostredníctvom biodegradácie lignínu. Hľadanie možného ekologického jednostupňového systému výroby vanilínu pomocou rôznych mechanizmov (biotransformácia/bionkonverzia) a rôznych biologických látok (mikroorganizmy/rastlinné bunky/izolované enzýmy) stále pokračuje [42].

Pšeničné otruby je lacný lignocelulózový odpad a obsahujú estery kyseliny ferulovej, ktoré sa môžu priamo použiť ako substrát na čistejšiu výrobu vanilínu. Využívanie otrúb ako suroviny pre výrobu vanilínu preto predstavuje zaujímavý spôsob likvidácie odpadov a zároveň ich využitie [42].

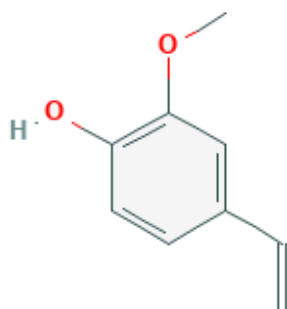


Obrázok 12: Štruktúrny vzorec vanilínu [43]

2.4.4. 4-vinylguaiacol

Zlúčenina 4-vinylguaiacol (4-VG) je obzvlášť cenným produktom v potravinárskom priemysle; napríklad vzniká pri metabolickej aktivite kvasieniek pri výrobe piva (belgické pšeničné pivo a nemecký Rauch). 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 acetovanilón a etylguaiacol, ako aj predchodca chemickej syntézy biologicky odbúrateľných vysoko pevných oksyločených polystyrénov [44].

V súčasnosti sa komerčný 4-VG získava chemickou dekarboxyláciou kyseliny ferulovej pomocou kovových katalyzátorov za drsných podmienok (vysoké pH), čo vyvoláva obavy o bezpečnosť produktu a nebezpečné odpady. Preto je použitie mikroorganizmov alebo enzýmov ako biokatalyzátorov za miernych podmienok spracovania sľubnou metódou na výrobu 4-VG. Najbežnejšie testovanými mikroorganizmami sú baktérie, vrátane *Streptomyces setonii*, *Cupriavidus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Lactobacillus farciminis* a *Bacillus spp.* [45].



Obrázok 13: Štruktúrny vzorec 4-vinylguaiacolu [46]

2.5. Súčasný výskum

Lignocelulózový materiál je veľmi zaujímavým východiskovým materiálom pre rôzne vedecké aplikácie vďaka svojej celoročnej dostupnosti ako obnoviteľného zdroja pre

priemyselnú spotrebu. Keďže ide o alternatívu ekonomického substrátu, vedci skúmajú rôzne procesy pri ktorých sa využívajú odvodené zlúčeniny z týchto materiálov. Odrody húb a baktérií syntetizujú určité degradujúce enzýmy, ktoré majú schopnosť depolymerizovať lignocelulóзовú biomasu. Lignocelulolytické enzýmy derivované z húb a baktérií majú vďaka stabilnej katalytickej aktivite a vysokým výťažkom premeny v súčasnosti vysoké spektrum priemyselných aplikácií. Okrem toho sú tieto materiály nákladovo efektívne, ekologické a netoxické pri nízkom príkone energie reakčného systému. Technicko-ekonomická analýza súčasných technológií naznačuje, že výroba enzýmov nie je komerčne životaschopná. Namiesto toho je sľubná ekonomická projekcia použitia prirodzene produkovaných ligninolytických enzýmov. Tento prístup môže zlepšiť výrobu z ekonomického hľadiska znížením výdavkov na substrát a zvýšením pridanej hodnoty lignocelulóзовého vedľajšieho produktu [47].

Biotransformácia kyseliny ferulovej na sensoricky aktívne látky z lignocelulóзовých materiálov bola uskutočnená už mnohokrát a naďalej sa pokračuje v hľadaní najvýhodnejšieho spôsobu transformácie a to z hľadiska ekonomického a ekologického. Medzi najnovšie výskumy patrí bionkonverzia kyseliny ferulovej, získanej z ananásových šupiek a ananásových korunných listov, na kyselinu vanilovú a vanilín pomocou *Aspergillus niger* I-1472 od Pei Ling Tanga a Osmana Hassana z Malajzie. V tomto výzkupe na rozdiel od stredoeurópskych pšeničných otrúb boli použité ananásové komponenty ktoré sú v Malajzii dostupné vo veľkom množstve pretože pri výrobe konzerv na ananás sa takmer 75% ovocia vyhodí ako odpad. Zvyšky ananásu sa bežne likvidujú spálením alebo rozložením kvôli zastaranej technológii a neznalosti farmárov a miestnych podnikateľov ohľadne existencie komerčného využitia zvyškov ananásu. Táto štúdia navrhuje nové použitie fenolových extraktov z ananásových šupiek a korunných listov na výrobu kyseliny vanilovej a vanilínu. V porovnaní s výluhom ananásových korunných listov, má výluh ananásových šupiek najvyšší obsah kyseliny ferulovej a fenolové zlúčeniny sa ukázali ako najlepší substrát na výrobu kyseliny vanilovej a vanilínu. Zistilo sa, že faktorom ovplyvňujúcim účinnosť biokonverzie kyseliny ferulovej na kyselinu vanilovú a vanilín je obsah kyseliny ferulovej a neferulátových fenolových zlúčenín. Iné zlúčeniny ako napríklad aldehyd alebo fenolové zlúčeniny, ktoré sú prítomné v surovom hydrolyzáte, ovplyvňujú výkonnosť mikroorganizmov pri fermentácii, zníženie molárneho výťažku a produkcie konečných produktov. Výsledky tohto výskumu však ukázali, že priame kŕmenie výluh z biomasy má svoje kladné aj záporné stránky. Aj keď sa výťažok kyseliny vanilovej znížil, kŕmením surovým extraktom bol výťažok vanilínu súčasne zvýšený. A teda ďalšie štúdie analýzy fenolovej zlúčeniny v roztoku zvyšku ananásu by mali byť vedené tak, aby došlo k ovplyvneniu chránenej zlúčeniny na metabolickej dráhe daného mikroorganizmu [48].

3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

V rámci experimentálnej časti tejto bakalárskej práce sa pracovalo s baktériami rodu *Cupriavidus*, s baktériami rodu *Halomonas* a s vybranými termofilnými baktériami. Do kultúry týchto baktérií bola pridaná kyselina ferulová za účelom jej transformácie na iné významné produkty. Úbytok kyseliny ferulovej a nárast koncentrácie nových produktov bol zaznamenaný prístrojom separačnej metódy HPLC. Okrem screeningu biotransformačného potenciálu sa vykonalo aj porovnanie sekvencie bakteriálnych enzýmov podieľajúcich sa na biotransformácii s proteínovými sekvenciami v databáze pomocou vyhľadávacieho nástroja BLAST.

3.1. Použité baktérie, chemikálie a prístroje

3.1.1. Použité baktérie

V experimentálnej časti práce boli použité baktérie rodu *Cupriavidus*: *Cupriavidus necator* H16 (CCM 3726), *Cupriavidus* sp. (DSM 19379), *Cupriavidus* sp. (DSM 19416), *Cupriavidus* sp. (DSM 25816) spolu s baktériami rodu *Halomonas*: *H. halophila* (CCM 3662), *H. organivorans* (CCM 7142T), *H. elongata* (CCM3756), *H. neptunia* (CCM 7107), *H. hydrothermalis* (CCM 7104) a s termofilnými baktériami: *Schlegelella thermodepolymerans* (DSM 15344), *Schlegelella thermodepolymerans* (DSM 15264), *Tepidimonas taiwanensis* (LMG 22826), *Rubrobacter xylanophilus* (DSM 9941).

3.1.2. Použité chemikálie

- Bromid sodný, NaBr, Lachema (ČR)
- Chlorid draselný, KCl, Onex (ČR)
- Chlorid hořečnatý hexahydrát, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, Penta (ČR)
- Chlorid sodný, NaCl, Lachema (ČR)
- Chlorid vápenatý dihydrát, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, Lachema (ČR)
- Folin-Ciocalteu's reagent, VWR Chemicals (F)
- Glukóza monohydrát, $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$, Lach-Ner (ČR)
- Hydrogenuhličitan sodný, $NaHCO_3$, Lach-Ner (ČR)
- Kyselina ferulová (*trans*), Sigma-Aldrich (DE)
- Nutrient Broth w/1% peptone (HiMedia, IND)
- Peptone, Bacteriological (HiMedia, IND)
- Síran hořečnatý heptahydrát, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Lach-Ner (ČR)
- Tryptone Soya Broth, Oxoid (ČR)
- Yeast Extract Powder (HiMedia, IND)

3.1.3. Použité vybavenie a prístroje

- Analytické váhy ew 620-3NM, (KERN)
- Centrifuga Hettich EBA20 (MANEKO)
- Kryoskúmavky

- Kvapalinový chromatograf Shimadzu
- Mikrostriekačka Hamilton
- Laminárny box Aura mini, (Bio air instruments)
- LUT Syringe Filters PES (30mm, 0,45um, pk/100)
- Magnetická miešačka bez ohrevu technoKartell, (MERCİ s.r.o.)
- Magnetická miešačka Magnetic stirrer, (BIOSAN)
- Magnetická miešačka bez ohrevu technoKartell, (MERCİ s.r.o.)
- Nanofotometr P 300, (Implen)
- Tlakový hrniec
- Vortex BENCHMIXER, (Benchmark Scientific Inc.)
- Bežné laboratórne sklo a vybavenie

3.2. Postup experimentálnej práce

3.2.1. Kultivácia baktérii *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus maleysiensis*

Kultivácia baktérii *Cupriavidus necator* H16 (CCM 3726), *Cupriavidus* sp. (DSM 19379), *Cupriavidus* sp. (DSM 19416) a *Cupriavidus* sp. (DSM 25816) prebiehala v živnom médiu, tzv. inokulu, ktoré bolo pripravené z Nutrient Brothu (NB) a dest. vody o koncentrácii 25 g/l. Celkový objem média bol 50 ml. Pripravené inokulá boli sterilizované v tlakovom hrnci cca 30 min a následne do týchto médií boli zaočkované vybrané bakteriálne kmene z kryoskúmaviek po 750 μ l. Očkovanie prebiehalo sterilne v laminárnom boxe, v dvoch paralelných prevedeniach. Zaočkované živné média s baktériami sa dali na trepačku nastavenú na optimálnu teplotu rastu baktérií (30°C, 180 rpm) na 24 hodín.



Obrázok 14: Kultivácia baktérii *Cupriavidus necator* H16 a *C. maleysiensis* na začiatku (vľavo) a po 24 hodinách na trepačke (vpravo)

3.2.2. Kultivácia baktérii *Halomonas halophila*, *H. organivorans*, *H. elongata*, *H. neptunia* a *H. hydrothermalis*

Na kultiváciu boli použité komplexné média K2 pre *H. halophila* (CCM 3662), K3 (B82) pre *H. organivorans* (CCM 7142T), *H. neptunia* (CCM 7107), *H. hydrothermalis* (CCM 7104) a K4 (B54) pre *H. elongata* (CCM 3756). Sterilizácia, očkovanie a kultivácia prebehla rovnako ako pri predošlých baktériách (30°C, 180 rpm).

Zloženie K2:

- Pepton 3 g
- Kvasničný extrakt 0,6 g
- NaCl 13,2 g
- Glukóza 0,2g

Zloženie K3 (B82):

- Yeast extract 2 g
- Pepton 1 g
- Glukóza 0,2 g
- NaCl 16,2 g
- MgSO₄·7H₂O 1,92 g
- MgCl₂·6H₂O 1,4 g
- CaCl₂·2H₂O 0,072 g
- KCl 0,4 g
- NaHCO₃ 0,012 g
- NaBr 0,0052 g
- pH 7,2

Zloženie K4 (B54):

- Nutrient Broth 5 g
- NaCl 6 g
- MgCl₂·6H₂O 1 g
- pH 7,2

3.2.3. Kultivácia baktérii *Schlegelella thermodepolymerans*, *Tepidimonas taiwanensis* a *Rubrobacter xylanophilus*

Na kultiváciu boli použité komplexné média: Nutrient broth pre *Schlegelella thermodepolymerans* (DSM 15344), *S. thermodepolymerans* (DSM 15264), *Tepidimonas taiwanensis* (LMG 22826) o koncentrácii 25 g/l a tryptón o koncentrácii 6 g/l pre *Rubrobacter xylanophilus* (DSM 9941). Sterilizácia, očkovanie a kultivácia prebehla pri teplote 50°C a 180 rpm.

3.2.4. Rozsuspendovanie buniek do čerstvého média s obsahom kyseliny ferulovej

Po 24 hodinách boli kultúry sterilne zcentrifugované pri 10000 otáčkach a trvaní 10 minút. Následne boli rozsuspendované v čerstvom živnom médiu o objeme 50 ml s obsahom kyseliny ferulovej o koncentrácii 0,5 g/l. Takto pripravené média boli ponechané ďalších 24 hodín na trepačke. Po 24 hodinách bolo z baniek odobratých 10 ml média, ktoré sa uchovali do kryoskúmaviek na analýzu a banky boli ponechané na trepačke ďalších 24 hodín, čím boli vzorky rozdelené na 24 hodinové a 48 hodinové.

3.2.5. Meranie optickej hustoty a pH

Na konci kultivácie s kyselinou ferulovou bola zmeraná optická hustota pomocou merania médií pri 630 nm na nanofotometri oproti destilovanej vode (blank). Vzorky boli 20krát nariadené destilovanou vodou priamo v kyvete na objem 1 ml. Meranie prebiehalo v troch paralelných prevedeniach. Ďalej bolo zistené pH médií pomocou pH papierikov. Tento istý postup sa taktiež opakoval pre 48 hodinové vzorky.

3.2.6. Spektrofotometrické stanovenie celkových fenolových látok

Na stanovenie celkových fenolových látok v pripravených kultúrach všetkých spomenutých baktérii s kyselinou ferulovou bola použitá Folin-Ciocalteuova metóda. Postup tejto metódy spočíval v tom, že najskôr bol pripravený štandard kyseliny gallovej na kalibráciu potrebnú pre výpočet koncentrácie fenolových látok vo vzorkách: na analytických váhach bolo zvážených 0,0250 g kyseliny gallovej, ktorá bola kvantitatívne prevedená do 25 ml odmernej banky a bola doliata vodou po značku. Potom boli vzorky nariadené podľa potreby. V digestore bolo do skúmaviek 10krát nariadené Folin-Ciocalteuovo činidlo. Do týchto skúmaviek bolo napipetovaných 50 μ l zriedených vzoriek, bol pridaný 1 ml destilovanej vody a 1 ml Na_2CO_3 . Takto pripravené roztoky boli zamiešané na Vortexe a boli ponechané 15 minút stáť. Po 15 minútach bola zmeraná absorbanca oproti destilovanej vode s F-C činidlom a Na_2CO_3 pri vlnovej dĺžke 750 nm.

3.2.7. Kalibrácia na HPLC

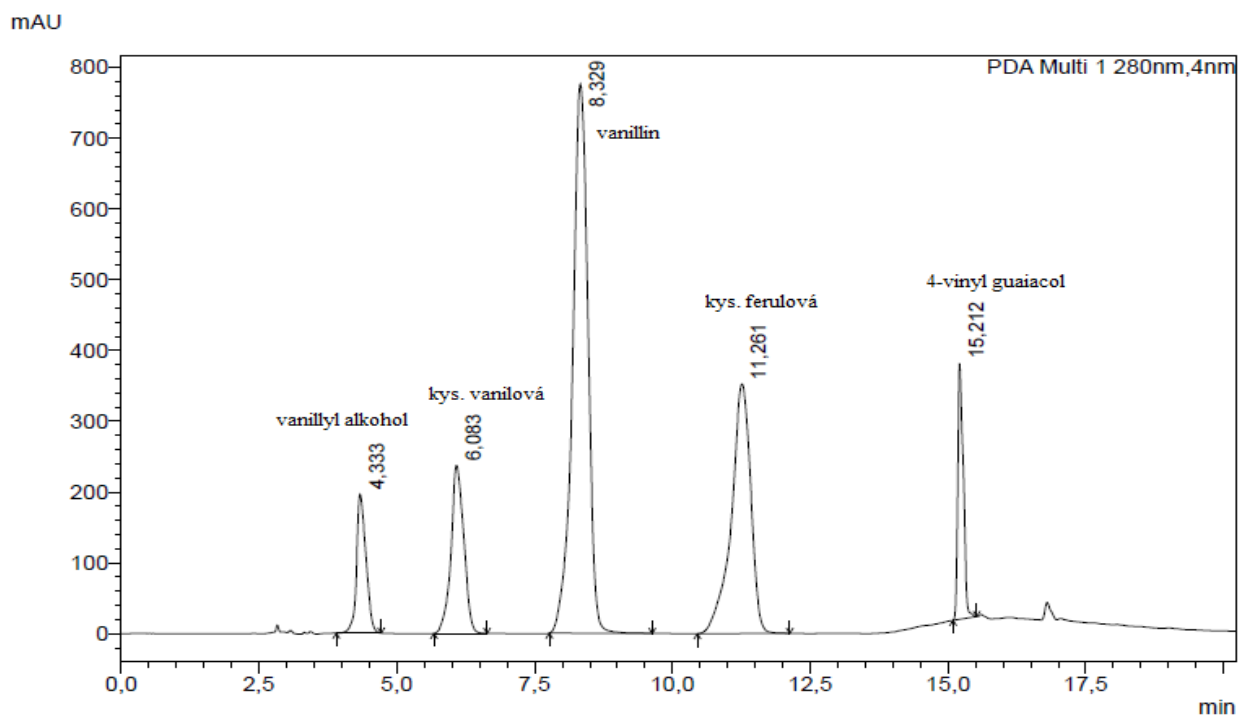
Na kalibráciu kvapalinového chromatografu Shimadzu pri stanovení cieleného úbytku kyseliny ferulovej a možného nárastu koncentrácie sledovaných látok (vanillylalkohol, k. vanilová, vanilín, 4-vinyl guaiacol) bola použitá gradientová elúcia. Bola použitá mobilná fáza acetonitril:1% kyselina octová v pomere 15:85, ktorá sa začala po 4. minúte miešať s acetonitrilom v pomere 30:70. Metóda prebiehala gradientovou elúciou a celková doba analýzy trvala 20 minút. Podrobnejšie parametre sú uvedené v Tabuľke 1. V Tabuľke 2 sú uvedené koncentrácie použitých štandardov pri metóde HPLC a ďalej je na Obrázku 15 znázornený ukázkový chromatogram kalibrácie HPLC s použitím štandardov o koncentrácii 100 mg/l.

Tabuľka 1: Použité parametre metódy HPLC

| | |
|------------------------------|--|
| Kolóna | Kinetex® 2,6 µm EVO C18 100 Å (LC Column 150 x 4,6 mm) |
| Mobilná fáza | Acetonitril:1% kyselina octová (15:85) |
| Prietok mobilnej fázy | 0,5 ml/min |
| Teplota | 35°C |
| Tlak | 250 bar |
| Gradientová elúcia | Acetonitril:mobilná fáza (70:30) (nástup po 4. minúte) |
| Detekcia | 230-450 nm (prebiehala pri 280 nm a 330 nm) |
| Detektor | UV/Vis |

Tabuľka 2: Koncentrácie použitých štandardov

| Štandard | Koncentrácia [mg/l] |
|-------------------|----------------------------|
| Vanillylalkohol | 110 |
| Kyselina vanilová | 120 |
| Vanilín | 150 |
| Kyselina ferulová | 150 |
| 4-vinyl guaiacol | 110 |



Obrázok 15: Chromatogram použitých štandardov o koncentrácii 100 mg/l pri zmiených podmienkach

3.2.8. Kvalitatívna a kvantitatívna analýza na HPLC

Prebehla analýza nakultivovaných kmeňov s kyselinou ferulovou na HPLC – bol sledovaný prípadný úbytok kyseliny ferulovej a jej biokonverzia na iné senzorycky aktívne látky. Analýza bola uskutočnená tak, že najskôr boli baktérie v kultúrach prefiltrované pomocou filtrov LUT Syringe Filters PES (30mm, 0,45um, pk/100) a až potom bol prefiltrovaný roztok pomocou mikrostriekačky Hamilton vložený do chromatografu. Analýza bola predĺžená na 25 minút z dôvodu posunu retenčného času kyseliny ferulovej a aby došlo k premytí mobilnej fázy.

3.2.9. Porovnanie proteínovej sekvencie enzýmov baktérii podieľajúcich sa na biotransformácii kyseliny ferulovej pomocou vyhľadávacieho nástroja BLAST

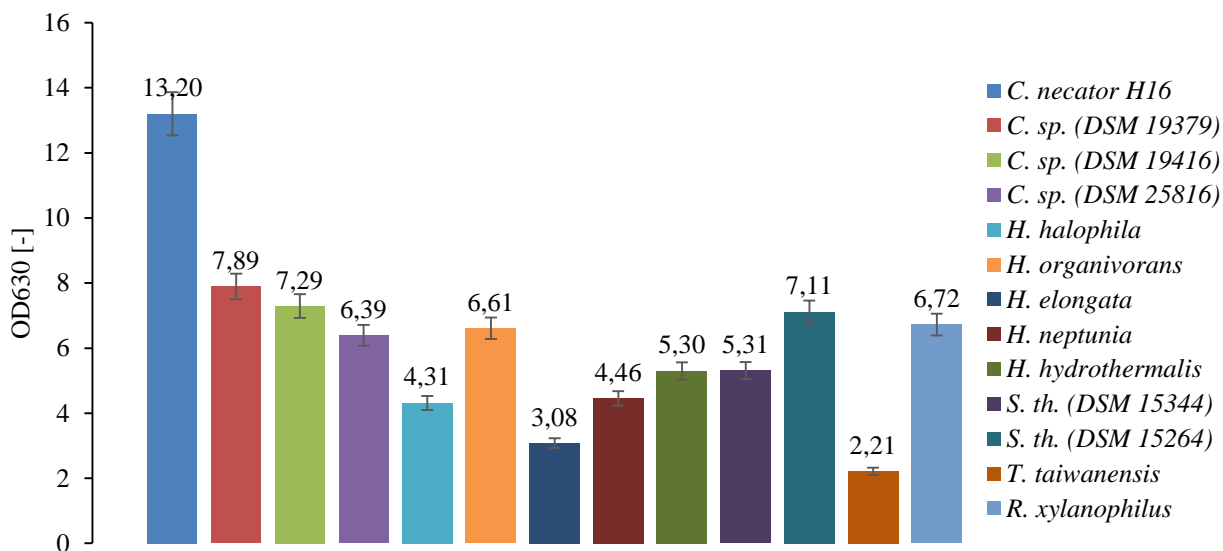
Biotransformácia kyseliny ferulovej na senzorycky aktívne látky prebieha vďaka bakteriálnym enzýmom, ktorých sekvencia bola vyhľadaná a následne porovnaná so sekvenciami proteínov v databáze a bola zistená štatistická významnosť pomocou vyhľadávacieho nástroja BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Dôležitým parametrom je hodnota E, ktorá udáva počet zásahov danej sekvencie, ktorý sa dá „očakávať“. Čím je hodnota E menšia, tým sú zhody v databáze kvalitnejšie.

Boli analyzované enzýmy β -oxidácie kyseliny ferulovej: feruloyl-CoA syntetáza, enoyl-CoA hydratáza/izomeráza, β -ketothioláza, vanilín dehydrogenáza; enzým dekarboxyláza a O-dimetyláza.

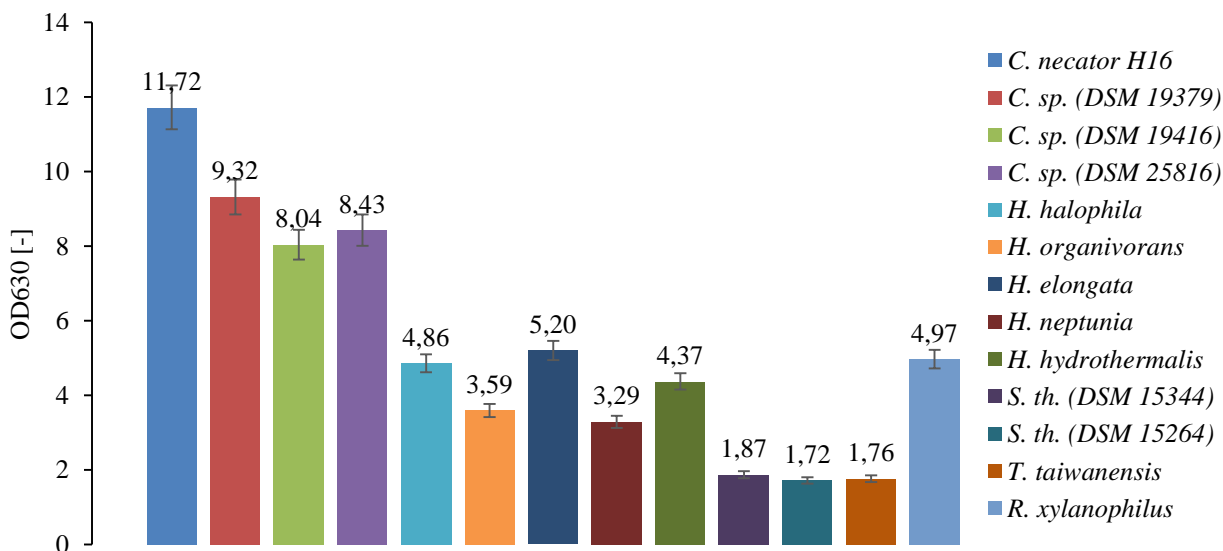
4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1. Namerané hodnoty optickej hustoty a pH

Všetky vzorky boli nariadené 20krát destilovanou vodou priamo v kvete na objem 1 ml a bola meraná optická hustota (optical density=OD) oproti destilovanej vode pri vlnovej dĺžke 630 nm. Bolo zmerané pH vzoriek pričom hodnota pH sa pohybovala v zásaditom rozmedzí 7-9, čo bolo spôsobené pravdepodobne zložením komplexných médií. Výsledky nameranej optickej hustoty vzoriek sú zobrazené na Obrázku 16 a 17.



Obrázok 16: Namerané OD pre vzorky po 24 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej

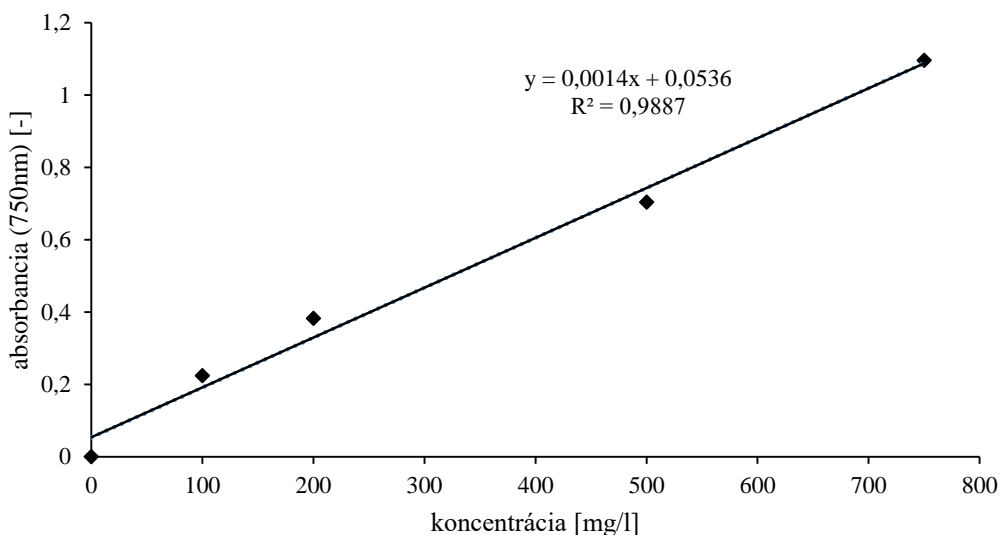


Obrázok 17: Namerané OD pre vzorky po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej

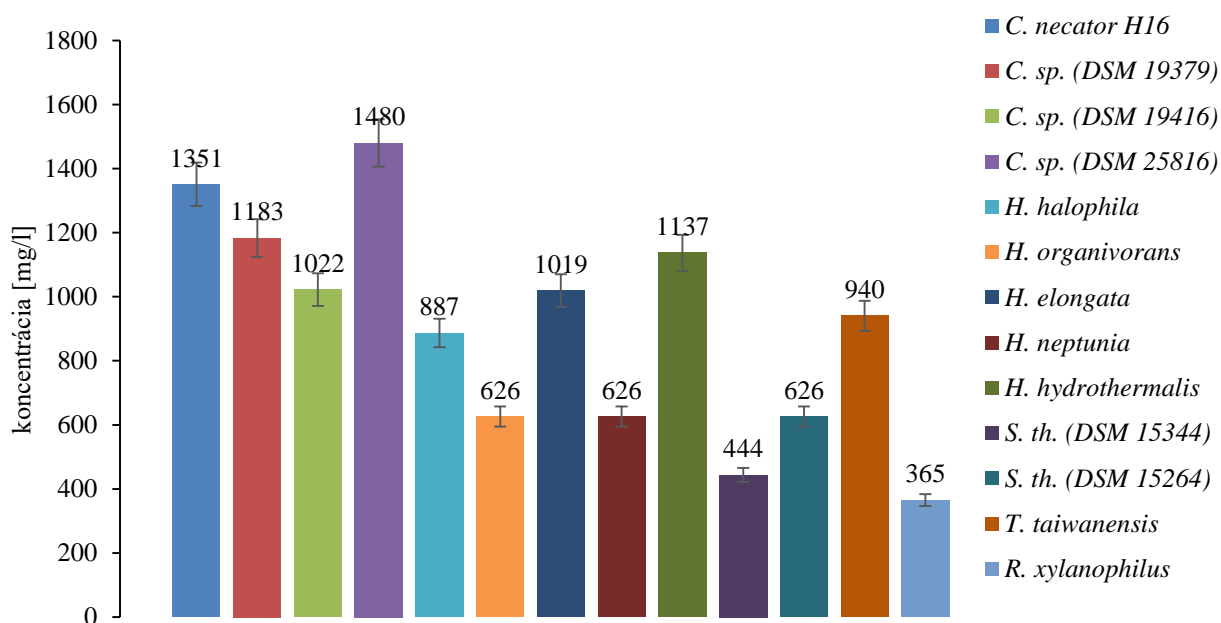
Optické hustoty vzoriek baktérii *Cupriavidus maleysensis*, *H. halophila* a *H. neptunia* po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej sú o niečo vyššie v porovnaní s 24 hodinovým pôsobením kyseliny ferulovej, čo znamená že tieto baktérie boli po pridaní kyseliny ferulovej naďalej schopné rasti. Zvyšné vzorky po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej mali OD nižšiu v porovnaní s 24 hodinovým pôsobením kyseliny ferulovej, čo naznačuje to, že tieto baktérie mali svoj rast inhibovaný premenou kyseliny ferulovej na jej metabolity. Najvyššia OD je u vzorky baktérie *Cupriavidus necator* H16 a najnižšia OD je u vzorky baktérie *T. taiwanensis*.

4.2. Spektrofotometrické stanovenie celkových fenolových látok

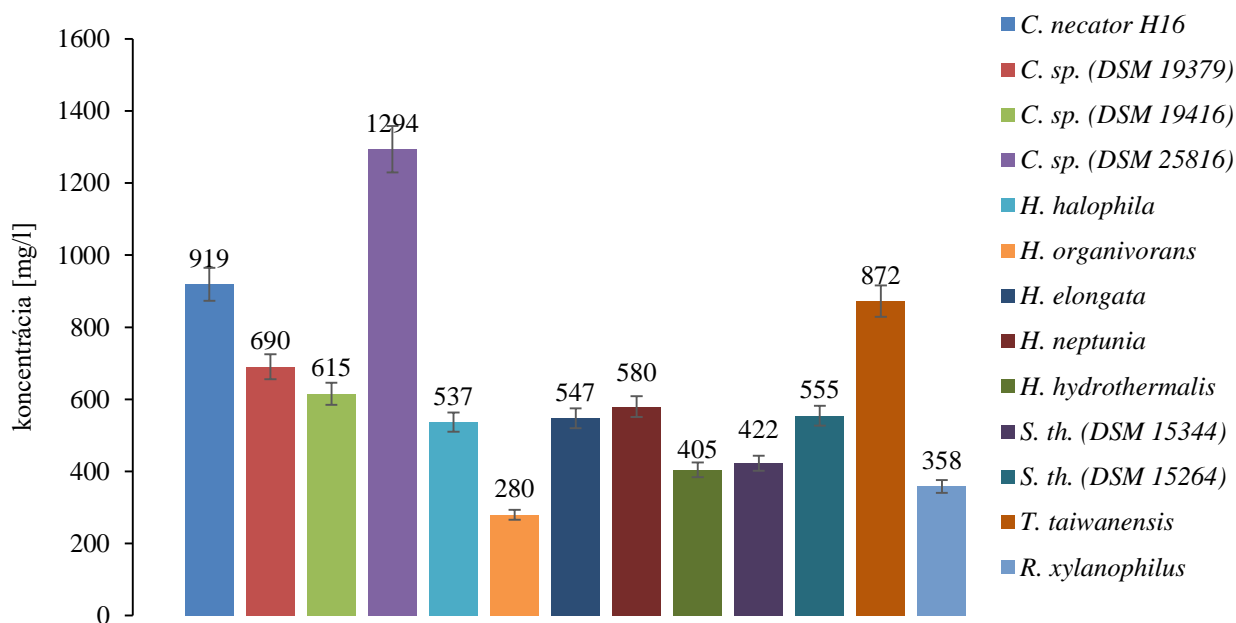
Bola prevedená kalibrácia meraním optickej hustoty štandardného roztoku kyseliny gallovej s koncentraciami 100, 200, 500, 750 mg/l pri vlnovej dĺžke 750 nm a bola zmeraná absorbancia vzoriek s Folin-Ciocalteuovým činidlom a Na_2CO_3 tiež pri 750 nm. Z nameraných hodnôt absorbancie štandardného roztoku kyseliny gallovej bola zostrojená kalibračná krivka a bola vyjadrená rovnica lineárnej trendovej spojnice (Obrázok 18). Dosadením nameraných hodnôt absorbancie vzoriek do rovnice lineárnej trendovej spojnice bola vypočítaná koncentrácia celkových fenolových látok vo vzorkách, ktorá bola zaokrúhľená na celé čísla (Obrázok 19, 20).



Obrázok 18: Kalibračná krivka stanovenia celkových fenolových látok



Obrázok 19: Koncentrácie celkových fenolových látok v 24 hodinových vzorkách



Obrázok 20: Koncentrácie celkových fenolových látok v 48 hodinových vzorkách

Koncentrácia celkových fenolových látok vo vzorkách po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej sú nižšie ako u vzoriek po 24 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej, čo je spôsobené postupnou degradáciou týchto fenolových látok po čase. Najvyššia koncentrácia celkových fenolových látok bola zaznamenaná pri vzorke baktérie *Cupriavidus* sp. (DSM 25816) a najnižšia

koncentrácia pri vzorke po 24 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej baktérie *R. xylanophilus* a u vzorky po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej baktérie *H. organivorans*. Tieto výsledky sú ale pravdepodobne výrazne skreslené komplexnou povahou použitých médií, ktoré sú bohaté na aromatické aminokyseliny alebo taktiež tým, že kalibrácia prebiehala na kyseline gallovej a nie kyseline ferulovej.

4.3. Kvalitatívna a kvantitatívna analýza na HPLC

Výsledky kvalitatívnej a kvantitatívnej analýzy vzoriek na HPLC sú rozdelené na vzorky s baktériami rodu *Cupriavidus*, vzorky s baktériami rodu *Halomonas* a vzorky s termofilnými baktériami. Uvedené výsledky boli spracované integráciou plochy píkov v chromatogramoch a následným výpočtom koncentrácie z kalibračnej krivky štandardov príslušných látok. Pri kyseline ferulovej bol používaný chromatogram nastavený na vlnovú dĺžku 330 nm a pri senzorickej aktívnych látkach to bola vlnová dĺžka 280 nm.

4.3.1. Vzorky s baktériami rodu *Cupriavidus*

Výsledky kvalitatívnej a kvantitatívnej analýzy vzoriek s baktériami rodu *Cupriavidus* na HPLC sú uvedené v tabuľkách 3-4. Použité skratky: FA=kyselina ferulová, 4-VG=4-vinylguaicol.

Tabuľka 3: Koncentrácia kyseliny ferulovej pred a po biotransformácii na stopové množstvo 4-vinylguaicolu a vanilínu pre vzorky s baktériami rodu Cupriavidus po 24 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej

| 24h | c (FA) pôvodná [mg/l] | c (FA) potom [mg/l] | úbytok FA [%] | c (4-VG) [mg/l] | c (vanilín) [mg/l] |
|--------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------|--------------------|-----------------------|
| <i>Cupriavidus necator H16</i> | 525 | 97 ± 31 | 82 | 6 ± 2 | 1 |
| <i>C. sp.</i> (DSM 19379) | 491 | 142 ± 36 | 71 | 2 ± 1 | - |
| <i>C. sp.</i> (DSM 19416) | 509 | 143 ± 36 | 72 | 2 ± 1 | - |
| <i>C. sp.</i> (DSM 25816) | 497 | 108 ± 30 | 78 | 4 ± 3 | - |

Tabuľka 4: Koncentrácia kyseliny ferulovej pred a po biotransformácii na stopové množstvo 4-vinylguaicolu a vanilínu pre vzorky s baktériami rodu Cupriavidus po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej

| 48h | c (FA) pôvodná [mg/l] | c (FA) potom [mg/l] | úbytok FA [%] | c (4-VG) [mg/l] | c (vanilín) [mg/l] |
|--------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------|--------------------|-----------------------|
| <i>Cupriavidus necator H16</i> | 525 | 209 ± 56 | 60 | 9 ± 5 | - |
| <i>C. sp.</i> (DSM 19379) | 491 | 284 ± 26 | 49 | 3 ± 1 | - |
| <i>C. sp.</i> (DSM 19416) | 509 | 282 ± 10 | 49 | 4 ± 1 | - |
| <i>C. sp.</i> (DSM 25816) | 497 | 327 ± 42 | 34 | 4 ± 1 | 2 |

Po kvalitatívnej a kvantitatívnej analýze HPLC vzoriek kyseliny ferulovej s baktériami *Cupriavidus necator* H16, *C. sp.* (DSM 19379), *C. sp.* (DSM 19416), *C. sp.* (DSM 25816) je zrejmé, že došlo k výraznému poklesu koncentrácie kyseliny ferulovej. Pri vzorkách po 24 hod. pôsobení kyseliny ferulovej došlo k priemernému poklesu koncentrácie kyseliny ferulovej o 76 % hm. a u 48 hodinových vzorkách bol pokles koncentrácie kyseliny ferulovej o 48 % hm. K tomuto poklesu došlo zrejme preto, že vybrané bakteriálne kmene spotrebovali kyselinu ferulovú v niektorej zo svojích metabolických dráh. K biotransformácii na ciele senzoricky aktívne látky došlo, ale jednalo sa iba o stopové množstvá 4-vinylguaiacolu a mizivé množstvo vanilínu.

4.3.2. Vzorky s baktériami rodu *Halomonas*

Výsledky kvalitatívnej a kvantitatívnej analýzy vzoriek s baktériami rodu *Halomonas* na HPLC sú uvedené v tabuľkách 5-6. Použité skratky: FA=kyselina ferulová, 4-VG=4-vinylguaiacol, VA=kyselina vanilová, konv.=konverzia.

Tabuľka 5: Koncentrácia kyseliny ferulovej pred a po biotransformácii na kyselinu vanilovú, 4-vinylguaiacol a stopové množstvo vanilínu pre vzorky s baktériami rodu *Halomonas* po 24 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej

| 24 h | FA pôvod [mg/l] | FA potom [mg/l] | úbytok FA [%] | VA [mg/l] | konv. FA na VA [%] | 4-VG [mg/l] | konv. FA na 4-VG [%] |
|--------------------------|-----------------|-----------------|---------------|-----------|--------------------|-------------|----------------------|
| <i>H. halophila</i> | 505 | 504 ± 41 | 0 | - | - | - | - |
| <i>H. organivorans</i> | 483 | 8 ± 1 | 98 | 71 ± 14 | 15 | - | - |
| <i>H. elongata</i> | 498 | 492 ± 57 | 1 | - | - | 7 ± 3 | 1 |
| <i>H. neptunia</i> | 506 | 27 ± 20 | 95 | 296 ± 80 | 59 | 11 ± 1 | 2 |
| <i>H. hydrothermalis</i> | 510 | 492 | 4 | - | - | - | - |

Tabuľka 6: Koncentrácia kyseliny ferulovej pred a po biotransformácii na kyselinu vanilovú, 4-vinylguaiacol a stopové množstvo vanilínu pre vzorky s baktériami rodu *Halomonas* po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej

| 48 h | FA pôvod [mg/l] | FA potom [mg/l] | úbytok FA [%] | VA [mg/l] | konv. FA na VA [%] | 4-VG [mg/l] | konv. FA na 4-VG [%] |
|--------------------------|-----------------|-----------------|---------------|-----------|--------------------|-------------|----------------------|
| <i>H. halophila</i> | 505 | 497 ± 26 | 2 | - | - | - | - |
| <i>H. organivorans</i> | 483 | 10 ± 3 | 98 | 11 ± 1 | 2 | - | - |
| <i>H. elongata</i> | 498 | 210 ± 26 | 58 | - | - | - | - |
| <i>H. neptunia</i> | 506 | - | 100 | - | - | 10 | 2 |
| <i>H. hydrothermalis</i> | 510 | 202 ± 28 | 60 | - | - | - | - |

Po analýze vzoriek s baktériami rodu *Halomonas* bol pozorovaný rapidný pokles koncentrácie kyseliny ferulovej pri vzorkách baktérii *H. organivorans* a *H. neptunia* už po 24 hod. pôsobení kyseliny ferulovej takmer na nulu. Pri vzorkách baktérii *H. elongata* a *H.*

hydrothermalis došlo k výraznejšiemu poklesu koncentrácie kyseliny ferulovej až po 48 hodinovom pôsobení kyseliny. Vzorky s baktériou *H. halomonas* na rozdiel od ostatných vzoriek nepreukázali žiaden pokles koncentrácie kyseliny ferulovej a tým pádom ani neprebehla jej biotransformácia.

K biotransformácii kyseliny ferulovej na 71 mg/l kyseliny vanilovej došlo pri vzorke s *H. organivorans* a na 296 mg/l kyseliny vanilovej pri vzorke s *H. neptunia* po 24 hod. pôsobení kyseliny ferulovej, čo činilo až 59% konverzie pôvodnej kyseliny ferulovej. Pri vzorkách s *H. organivorans* a *H. neptunia* po 48 hod. pôsobení kyseliny ferulovej už ale došlo k degradácii kyseliny vanilovej. Ďalej boli ešte zachytené stopové množstvá 4-vinylguaiacol pri vzorkách s *H. elongata* a *H. neptunia* po 24 hod. pôsobení kyseliny ferulovej a mizivé množstvo vanilínu.

4.3.2. Vzorky s termofilnými baktériami

Výsledky kvalitatívnej a kvantitatívnej analýzy vzoriek s termofilnými baktériami *Schlegelella thermodepolymerans* (DSM 15344), *S. thermodepolymerans* (DSM 15264), *Tepidimonas taiwanensis* a *Rubrobacter xylanophilus* na HPLC sú uvedené v tabuľkách 7-8. Použité skratky: FA=kyselina ferulová, 4-VG=4-vinylguaiacol, VA=kyselina vanilová, konv.=konverzia.

Tabuľka 7: Koncentrácia kyseliny ferulovej pred a po biotransformácii na kyselinu vanilovú, 4-vinylguaiacol a stopové množstvo vanilínu pre vzorky s termofilnými baktériami po 24 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej

| 24 h | FA pôvod [mg/l] | FA potom [mg/l] | Úbytok FA [%] | VA [mg/l] | konv. FA na VA [%] | 4-VG [mg/l] | konv. FA na 4-VG [%] |
|--|-----------------|-----------------|---------------|-----------|--------------------|-------------|----------------------|
| <i>S. thermodepolymerans</i> (DSM 15344) | 510 | 105 ± 30 | 79 | 33 ± 8 | 7 | 81 ± 3 | 16 |
| <i>S. thermodepolymerans</i> (DSM 15264) | 491 | 10 ± 1 | 98 | 76 ± 1 | 16 | 71 ± 4 | 15 |
| <i>T. taiwanensis</i> | 506 | 185 ± 8 | 63 | - | - | - | - |
| <i>R. xylanophilus</i> | 486 | 224 ± 55 | 54 | - | - | - | - |

Tabuľka 8: Koncentrácia kyseliny ferulovej pred a po biotransformácii na kyselinu vanilovú, 4-vinylguaiacol a stopové množstvo vanilínu pre vzorky s termofilnými baktériami po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej

| 48 h | FA pôvod [mg/l] | FA potom [mg/l] | Úbytok FA [%] | VA [mg/l] | konv. FA na VA [%] | 4-VG [mg/l] | konv. FA na 4-VG [%] |
|--|-----------------|-----------------|---------------|-----------|--------------------|-------------|----------------------|
| <i>S. thermodepolymerans</i> (DSM 15344) | 510 | 2 | 100 | 100 ± 6 | 20 | - | - |
| <i>S. thermodepolymerans</i> (DSM 15264) | 491 | 2 | 100 | 88 ± 4 | 18 | - | - |
| <i>T. taiwanensis</i> | 506 | 125 | 75 | 61 | 12 | 32 | 6 |
| <i>R. xylanophilus</i> | 486 | 158 ± 36 | 67 | - | - | 56 ± 2 | 12 |

Došlo k výraznému poklesu koncentrácie kyseliny ferulovej pri všetkých vzorkách ale najmä pri vzorkách *S. thermodepolymerans* (DSM 15344) a *S. thermodepolymerans* (DSM 15264), kde koncentrácia kyseliny ferulovej klesla na nulu.

Biotransformácia prebehla u vzorkách *S. thermodepolymerans* (DSM 15344) a *S. thermodepolymerans* (DSM 15264) po 24 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej a u všetkých vzorkách po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej. Pri oboch vzorkách *S. thermodepolymerans* došlo k vzniku 33 mg/l a 76 mg/l kyseliny vanilovej a 81 mg/l a 71 mg/l 4-vinylguaiacolu, ktorý už ale degradoval pri vzorkách po 48 hod. pôsobení kyseliny ferulovej. U vzorky s baktériou *T. taiwanensis* po 48 hod. pôsobení kyseliny ferulovej vzniklo 61 mg/l kyseliny vanilovej a 32 mg/l 4-vinylguaiacolu a u vzorky *R. xylanophilus* vzniklo 56 mg/l 4-vinylguaiacolu a stopové množstvo vanilínu.

4.4. Porovnanie proteínovej sekvencie enzýmov baktérii podieľajúcich sa na biotransformácii kyseliny ferulovej pomocou vyhľadávacieho nástroja BLAST

Porovnané proteínové sekvencie enzýmov β -oxidácie kyseliny ferulovej: feruloyl-CoA syntetáza, enoyl-CoA hydratáza/izomeráza, β -ketothioláza, vanilín dehydrogenáza; enzýmu dekarboxyláza, O-dimetyláza a referenčných sekvencií NCBI (National Center for Biotechnology Information) sú uvedené v tabuľkách 9-14. Pozn.: Pri baktérii *H. neptunia* nebola nájdená žiadna podobná sekvencia enzýmov, čo je pravdepodobne spôsobené tým, že nemá osekvenovaný celý genóm.

4.4.1. Feruloyl-CoA syntetáza

Proteínová sekvencia feruloyl-CoA syntetázy bola porovnaná s referenčným enzýmom feruloyl-CoA syntetázy (kódovaný génom fcs) mikroorganizmu *Pseudomonas putida* s číslom Q88HK0 (Q88HK0_PSEPK).

Tabuľka 9: Porovnané proteínové sekvencie feruloyl-CoA syntetázy

| Baktéria | E | Referenčná sekvencia NCBI |
|--|----------------------|---------------------------|
| <i>Cupriavidus necator</i> | 0,0 | WP_153948271.1 |
| <i>Cupriavidus maleysiensis</i> | - | - |
| <i>Halomonas halophila</i> | - | - |
| <i>Halomonas organivorans</i> | 0,0 | WP_183386034.1 |
| <i>Halomonas elongata</i> | 0,0 | WP_013333709.1 |
| <i>Halomonas neptunia</i> | - | - |
| <i>Halomonas hydrothermalis</i> | $7,0 \cdot 10^{-23}$ | WP_039175079.1 |
| <i>Schlegelella thermodepolymerans</i> | 0,0 | WP_104356478.1 |
| <i>Tepidimonas taiwanensis</i> | - | - |
| <i>Rubrobacter xylanophilus</i> | - | - |

Feruloyl-CoA syntetáza je iniciačným enzýmom β -oxidácie kyseliny ferulovej a tým zohráva dôležitú úlohu v procese biotransformácie. Boli tu zistené najnižšie hodnoty E rovné nule a tým pádom najkvalitnejšie zhody v databáze (s výnimkou *H. hydrothermalis*), pričom ale boli nájdené len pre baktérie *Cupriavidus necator*, *Halomonas organivorans*, *Halomonas elongata*, *Halomonas hydrothermalis* a *Schlegelella thermodepolymerans*. Tieto hodnoty vyjadrujú fakt, že pri väčšine mikroorganizmov došlo k významnému poklesu koncentrácie kyseliny ferulovej.

4.4.2. Enoyl-CoA hydratáza/izomeráza

Proteínová sekvencia enoyl-CoA hydratázy/izomerázy bola porovnaná s referenčným enzýmom enoyl-CoA hydratáza (kódovaný génom ech) mikroorganizmu *Thermus thermophilus* s číslom P83702 (P83702_THETH).

Tabuľka 10: Porovnané proteínové sekvencie enoyl-CoA hydratázy/izomerázy

| Baktéria | E | Referenčná sekvencia NCBI |
|--|----------------------|---------------------------|
| <i>Cupriavidus necator</i> | $3,0 \cdot 10^{-67}$ | WP_043349911.1 |
| <i>Cupriavidus maleysiensis</i> | $7,0 \cdot 10^{-54}$ | WP_071071829.1 |
| <i>Halomonas halophila</i> | $3,0 \cdot 10^{-73}$ | WP_146909194.1 |
| <i>Halomonas organivorans</i> | $1,0 \cdot 10^{-72}$ | WP_183387663.1 |
| <i>Halomonas elongata</i> | - | - |
| <i>Halomonas neptunia</i> | - | - |
| <i>Halomonas hydrothermalis</i> | $3,0 \cdot 10^{-72}$ | WP_096922526.1 |
| <i>Schlegelella thermodepolymerans</i> | $4,0 \cdot 10^{-61}$ | WP_170067429.1 |
| <i>Tepidimonas taiwanensis</i> | $1,0 \cdot 10^{-63}$ | WP_043702763.1 |
| <i>Rubrobacter xylanophilus</i> | $2,0 \cdot 10^{-71}$ | WP_011565309.1 |

Významným zistením boli hodnoty E pri enoyl-CoA hydratázy/izomerázy, ktoré boli nájdené pre všetky baktérie až na *H. elongata* a *H. neptunia*, pričom hodnoty E tohto enzýmu baktérii dosiahli „veľmi dobrú“ hodnotu E vzhľadom na to, že najkvalitnejšie zhody v databáze sú pri hodnote $E < 1 \cdot 10^{-50}$. Enoyl-CoA hydratáza/izomeráza je druhým kľúčovým enzýmom β -

oxidácie kyseliny ferulovej, ktorý rozdeľuje túto metabolickú dráhu na β -oxidačnú a β -neoxidačnú degradáciu. Vzhľadom na nízke hodnoty parametru E sa taktiež dá povedať, že sa tento enzým podieľal na poklese koncentrácie kyseliny ferulovej pri jej biotransformácii, čo potvrdzujú aj výsledky zo screeningu.

4.4.3. β -ketothioláza (acetoacetyl-CoA thioláza)

Proteínová sekvencia β -ketothiolázy (acetoacetyl-CoA thiolázy) bola porovnaná s referenčným enzýmom β -ketothioláza BktB (kódovaný génom *aat*) mikroorganizmu *Cupriavidus necator* s číslom Q0KBP1 (BKTB_CUPNH).

Tabuľka 11: Porovnané proteínové sekvencie β -ketothiolázy

| Baktéria | E | Referenčná sekvencia NCBI |
|--|-----------------------|---------------------------|
| <i>Cupriavidus necator</i> | 0,0 | WP_171514676.1 |
| <i>Cupriavidus maleysiensis</i> | $3,0 \cdot 10^{-72}$ | WP_071068787.1 |
| <i>Halomonas halophila</i> | - | - |
| <i>Halomonas organivorans</i> | - | - |
| <i>Halomonas elongata</i> | - | - |
| <i>Halomonas neptunia</i> | - | - |
| <i>Halomonas hydrothermalis</i> | $2,0 \cdot 10^{-143}$ | WP_172420434.1 |
| <i>Schlegelella thermodepolymerans</i> | - | - |
| <i>Tepidimonas taiwanensis</i> | - | - |
| <i>Rubrobacter xylanophilus</i> | $3,0 \cdot 10^{-139}$ | WP_011565330.1 |

β -ketothioláza je súčasťou β -neoxidačnej dráhy ktorou dochádza k vzniku kyseliny vanilovej. Hodnoty E u β -ketothiolázy sú veľmi nízke, čo naznačuje vysokú kvalitu zhôd v databáze, lenže tieto hodnoty boli nájdené len pre baktérie *Cupriavidus necator*, *Cupriavidus maleysiensis*, *Halomonas hydrothermalis* a *Rubrobacter xylanophilus*. Tieto hodnoty by mohli vysvetľovať príčinu vzniku kyseliny vanilovej pri vybraných mikroorganizmoch. Hodnoty parametru E mikroorganizmov pri ktorých došlo k nárastu koncentrácie kyseliny vanilovej boli však vyhládané len pre *Halomonas hydrothermalis*.

4.4.4. Vanilín dehydrogenáza

Proteínová sekvencia vanilín dehydrogenázy bola porovnaná s referenčným enzýmom vanilín dehydrogenáza (kódovaný génmi *vdh*) mikroorganizmu *Pseudomonas sp.* s číslom O05619 (VDH_PSEUH).

Tabuľka 12: Porovnané proteínové sekvencie vanilín dehydrogenázy

| Baktéria | E | Referenčná sekvencia NCBI |
|--|-----------------------|---------------------------|
| <i>Cupriavidus necator</i> | $3,0 \cdot 10^{-167}$ | SCU91471.1 |
| <i>Cupriavidus maleysiensis</i> | 0,0 | WP_071071421.1 |
| <i>Halomonas halophila</i> | - | - |
| <i>Halomonas organivorans</i> | - | - |
| <i>Halomonas elongata</i> | 0,0 | WP_041602199.1 |
| <i>Halomonas neptunia</i> | - | - |
| <i>Halomonas hydrothermalis</i> | 0,0 | WP_096921932.1 |
| <i>Schlegelella thermodepolymerans</i> | $5,0 \cdot 10^{-77}$ | WP_132764455.1 |
| <i>Tepidimonas taiwanensis</i> | - | - |
| <i>Rubrobacter xylanophilus</i> | $1,0 \cdot 10^{-82}$ | WP_041328212.1 |

Hodnoty E u vanilín dehydrogenázy sú tiež nízke, čo znamená taktiež veľmi vysokú kvalitu zhôd v databáze pričom hodnoty E boli nájdené pre baktérie *Cupriavidus necator*, *Cupriavidus maleysiensis*, *Halomonas elongata*, *Halomonas hydrothermalis*, *Schlegelella thermodepolymerans*, *Rubrobacter xylanophilus*. Tieto hodnoty tiež môžu naznačovať to, že pri screeningu nebol pozorovaný nárast koncentrácie vanilínu pretože ho vanilín dehydrogenáza zdegradovala.

4.4.5. Dekarboxyláza kyseliny ferulovej

Proteínová sekvencia dekarboxyláza bola porovnaná s referenčným enzýmom dekarboxyláza kyseliny ferulovej 1 (kódovaný génmi *fdc1*) mikroorganizmu *Aspergillus niger* s číslom A2QHE5 (FDC1_ASPNC).

Tabuľka 13: Porovnané proteínové sekvencie dekarboxylázy

| Baktéria | E | Referenčná sekvencia NCBI |
|--------------------------------------|----------------------|---------------------------|
| <i>Cupriavidus necator</i> | $2,0 \cdot 10^{-36}$ | WP_078198060.1 |
| <i>Cupriavidus maleysiensis</i> | - | - |
| <i>Halomonas halophila</i> | - | - |
| <i>Halomonas organivorans</i> | - | - |
| <i>Halomonas elongata</i> | - | - |
| <i>Halomonas neptunia</i> | - | - |
| <i>Halomonas hydrothermalis</i> | $1,0 \cdot 10^{-54}$ | WP_172419875.1 |
| <i>Schlegella thermodepolymerans</i> | $6,0 \cdot 10^{-39}$ | WP_132763668.1 |
| <i>Tepidimonas taiwanensis</i> | $5,0 \cdot 10^{-38}$ | WP_043703213.1 |
| <i>Rubrobacter xylanophilus</i> | - | - |

Hodnoty E u dekarboxylázy kyseliny ferulovej sú väčšie ako $1 \cdot 10^{-50}$ (až na *Halomonas hydrothermalis*), čo už nenaznačuje vysokú kvalitu zhôd v databáze. Hodnota parametru E bola vyhľadaná iba pre baktérie *Cupriavidus necator*, *Halomonas hydrothermalis*, *Schlegella thermodepolymerans* a *Tepidimonas taiwanensis*.

4.4.6. O-dimetyláza

Proteínová sekvencia O-dimetyláza bola porovnaná s referenčným enzýmom aromatická O-dimetyláza (kódovaný génom *gcoB*) mikroorganizmu *Amycolatopsis* sp. s číslom P0DPQ8 (GCOB_AMYS7).

Tabuľka 14: Porovnané proteínové sekvencie O-dimetylázy

| Baktéria | E | Referenčná sekvencia NCBI |
|--|----------------------|---------------------------|
| <i>Cupriavidus necator</i> | - | - |
| <i>Cupriavidus maleysiensis</i> | - | - |
| <i>Halomonas halophila</i> | - | - |
| <i>Halomonas organivorans</i> | $2,0 \cdot 10^{-45}$ | WP_183387422.1 |
| <i>Halomonas elongata</i> | - | - |
| <i>Halomonas neptunia</i> | - | - |
| <i>Halomonas hydrothermalis</i> | - | - |
| <i>Schlegelella thermodepolymerans</i> | $3,0 \cdot 10^{-9}$ | TCP08327.1 |
| <i>Tepidimonas taiwanensis</i> | $2,0 \cdot 10^{-5}$ | WP_043700105.1 |
| <i>Rubrobacter xylanophilus</i> | - | - |

Hodnoty E u O-dimetylázy sú už zďaleka väčšie ako $1 \cdot 10^{-50}$, čo znamená, že pri tomto enzýme bakteriálnych rodov nie sú kvalitné zhody sekvencií v databáze. Táto hodnota bola taktiež vyhľadaná iba pre *Halomonas organivorans*, *Schlegelella thermodepolymerans* a *Tepidimonas taiwanensis*.

5. ZÁVER

- Cieľom bakalárskej práce bola príprava kultivačných médií s kyselinou ferulovou, zavedenie HPLC metodiky pre stanovenie kyseliny ferulovej a jej metabolitov a následný screening biotransformačného potenciálu u vybraných mikroorganizmov.
- Okrem toho bolo prevedené meranie optickej hustoty a pH pripravených médií. pH sa pohybovalo v zásaditom prostredí 7-9 a bolo to spôsobené pravdepodobne zložením komplexných médií. Optické hustoty vzoriek baktérii *Cupriavidus maleysensis*, *H. halophila* a *H. neptunia* po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej boli o niečo vyššie v porovnaní s 24 hod. pôsobení kyseliny ferulovej, čo znamená že tieto baktérie boli po pridaní kyseliny ferulovej naďalej schopné rastu. Zvyšné vzorky po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej mali OD nižšiu v porovnaní s 24 hod. hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej, čo naznačuje to, že tieto baktérie mali svoj rast inhibovaný premenou kyseliny ferulovej na jej metabolity.
- Ďalej bolo prevedené spektrofotometrické stanovenie celkových fenolových látok pričom bol pozorovaný väčší pokles absorbancie vzoriek po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej pretože po čase dochádzalo k degradácii fenolových látok. Tieto výsledky boli ale pravdepodobne výrazne skreslené komplexnou povahou použitých médií, ktoré sú bohaté na aromatické aminokyseliny alebo taktiež tým, že kalibrácia prebiehala na kyseline gallovej a nie kyseline ferulovej.
- Porovnaním výsledkov screeningu biotransformačného potenciálu vzoriek jednotlivých rodov baktérii sa dospelo k záveru, že termofilné baktérie a halofilná baktéria *Halomonas neptunia* sú najvhodnejšími kandidátmi na biotransformáciu kyseliny ferulovej na sensoricky aktívne látky. Pri oboch vzorkách *S. thermodepolymerans* došlo k vzniku došlo k vzniku 33 mg/l a 76 mg/l kyseliny vanilovej a 81 mg/l a 71 mg/l 4-vinylguaiacolu po 24 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej. Avšak po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej už 4-vinylguaiacol degradoval. U vzorky s baktériou *T. taiwanensis* po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej vzniklo 61 mg/l kyseliny vanilovej a 32 mg/l 4-vinylguaiacolu a u vzorky *R. xylanophilus* vzniklo 56 mg/l 4-vinylguaiacolu. U vzorky s baktériou *H. neptunia* po 24 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej došlo k jej premene na 296 mg/l kyseliny vanilovej čo činilo až 59% konverzie pôvodnej kyseliny ferulovej a u vzorky s baktériou *H. organivorans* po 24 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej vzniklo 71 mg/l kyseliny vanilovej. Avšak po 48 hodinovom pôsobení kyseliny ferulovej kyselina vanilová degradovala.
- Poslednou úlohou bolo porovnanie sekvencií bakteriálnych enzýmov podieľajúcich sa na biotransformácii kyseliny ferulovej so sekvenciami proteínov v databáze pomocou vyhľadávacieho nástroja BLAST. Vzľadom na to, že sekvencia enoyl-CoA hydratázy/izomerázy bola vyhladaná a porovnaná pre všetky použité mikroorganizmy okrem dvoch a ich hodnota parametru E bola nižšia ako $1 \cdot 10^{-5}$, čo vykazuje vysokú kvalitu zhôd sekvencií v databáze, sa dá povedať, že tento enzým je veľmi významným faktorom pri biotransformácii kyseliny ferulovej na sensoricky aktívne látky. Naproti tomu sekvencia feruloyl-CoA syntetáza vykazuje najnižšiu hodnotu parametru E a tým pádom najkvalitnejšie zhody sekvencií v databáze ale len pre polovicu použitých

baktérii. Každopádne, feruloyl-CoA syntetáza je vzhľadom na kvalitnú zhodu sekvencii v databáze kľúčovým enzýmom v premene kyseliny ferulovej na jej metabolity. Túto skutočnosť potvrdzujú aj namerané koncentrácie kyseliny ferulovej a jej metabolizmov. Ďalšie dva sledované enzýmy s nízkou hodnotou parametra E, ktoré sú súčasťou β -oxidácie kyseliny ferulovej boli acetoacetyl-CoA thioláza a vanilín dehydrogenáza ale ich sekvencia bola znova vyhľadaná iba zhruba pre polovicu použitých baktérii. Napriek tomu, vanilín dehydrogenáza môže byť jedným z dôvodov prečo pri screeningu nebol pozorovaný nárast koncentrácie vanilínu. Naproti tomu nízke hodnoty parametru E acetoacetyl-CoA thiolázy môžu naznačovať nárast koncentrácie kyseliny vanilovej pri vybraných mikroorganizmoch. Poslednými sledovanými a porovnávanými sekvenciami bola dekarboxyláza a O-dimetyláza pričom ich sekvencie nemali kvalitné zhody v databáze a tým pádom nezohrávali zásadnú rolu pri biotransformácii kyseliny ferulovej.

6. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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>
- [4] KIM, Dongyeop a Gi Dong HAN. Fermented Rice Bran Attenuates Oxidative Stress. *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*. Elsevier, 2014, 2014, s. 467-480. DOI: 10.1016/B978-0-12-401716-0.00036-2. ISBN 9780124017160. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124017160000362>
- [5] TORRE, Paolo, Bahar ALIAKBARIAN, Beatriz RIVAS, José Manuel DOMÍNGUEZ a Attilio CONVERTI. Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*. 2008, **40**(3), 500-506. DOI: 10.1016/j.bej.2008.02.005. ISSN 1369703X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X08000466>
- [6] Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2011, October 21). *Bran*. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/topic/bran-cereal-by-product>
- [7] 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>
- [8] MATHEW, Sindhu a T. Emilia ABRAHAM. Ferulic Acid: An Antioxidant Found Naturally in Plant Cell Walls and Feruloyl Esterases Involved in its Release and Their Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2008, **24**(2-3), 59-83. DOI:

10.1080/07388550490491467. ISSN 0738-8551. Dostupné také z:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388550490491467>

- [9] ABOLGHASEMI, Reyhaneh, Abbas Mousavi HERIS a Mohsen Saberi ESFEEDVAJANI. Some Iranian medicinal plants to treat paralysis caused by spinal cord injury. *Academic Journals: Journal of Medicinal Plants Research*. 2013, **7**(39), 2933-2939. ISSN 1996-0875.
- [10] MOORE, K. J. a H. J. G. JUNG. Lignin and fiber digestion. *Journal of Range Management*. 2001, **54**(4). ISSN 0022-409X. Dostupné z:
doi:10.2458/azu_jrm_v54i4_moore
- [11] ZDUŃSKA, Kamila, Agnieszka DANA, Anna KOŁODZIEJCZAK a Helena ROTSZTEJN. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2018, **31**(6), 332-336. ISSN 1660-5527. Dostupné z:
doi:10.1159/000491755
- [12] SRINIVASAN, Marimuthu, Adluri R. SUDHEER a Venugopal P. MENON. Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2007, **40**(2), 92-100. ISSN 0912-0009. Dostupné z:
doi:10.3164/jcbrn.40.92
- [13] STAVOVA, E., PORIZKA, J., STURSA, V., ENEV, V., & DIVIS, P. (2017). Extraction of ferulic acid from wheat bran by alkaline hydrolysis. *MendelNet*, 24, 574-579.
- [14] AHMAD, Ejaz a Kamal K. PANT. Lignin Conversion: A Key to the Concept of Lignocellulosic Biomass-Based Integrated Biorefinery. *Waste Biorefinery*. Elsevier, 2018, 2018, s. 409-444. ISBN 9780444639929. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63992-9.00014-8
- [15] GIET, Jean-Michel, Olivier ROISEUX a Christophe BLECKER. Enzymatic process development for the extraction of ferulic from wheat bran [abstract]. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. B-5030 Gembloux (Belgium): Les Presses agronomiques de Gembloux, 2010, **14**(2), 537-540. ISSN 1780-4507.
- [16] FAULDS, C.B., F.O. ALIWAN, R.P. DE VRIES, R.W. PICKERSGILL, J. VISSER a G. WILLIAMSON. Chemical and thermal stability of ferulic acid (feruloyl) esterase from *Aspergillus*. *Stability and Stabilization of Biocatalysts, Proceedings of an International Symposium organized under auspices of the Working Party on Applied Biocatalysis of the European Federation of Biotechnology, the University of Cordoba*,

Spain, and the Spanish Society of Biotechnology. Elsevier, 1998, 1998, s. 41-46. Progress in Biotechnology. DOI: 10.1016/S0921-0423(98)80007-5. ISBN 9780444829702. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921042398800075>

[17] ROSAZZA, J P N, Z HUANG, L DOSTAL, T VOLM a B ROUSSEAU. Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid. *Journal of Industrial Microbiology*. 1995, **15**(6), 457-471. DOI: 10.1007/BF01570016. ISSN 0169-4146. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01570016>

[18] MÄKELÄ, Miia R., Mila MARINOVIĆ, Paula NOUSIAINEN, et al. Aromatic Metabolism of Filamentous Fungi in Relation to the Presence of Aromatic Compounds in Plant Biomass. *Advances in Applied Microbiology*. Volume 91. Elsevier, 2015, 2015, s. 63-137. Advances in Applied Microbiology. DOI: 10.1016/bs.aambs.2014.12.001. ISBN 9780128022504. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065216414000525>

[19] DIMAROGONA, M. a E. TOPAKAS. Regulation and Heterologous Expression of Lignocellulosic Enzymes in *Aspergillus*. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 2016, 2016, s. 171-190. DOI: 10.1016/B978-0-444-63505-1.00012-9. ISBN 9780444635051. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444635051000129>

[20] 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>

[21] 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.

[22] ŚWIZDOR, Alina, Anna PANEK, Natalia MILECKA-TRONINA a Teresa KOLEK. 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>

[23] KALBANDE, Bipinchandra B. a Anita S. PATIL. Plant tissue culture independent *Agrobacterium tumefaciens* mediated In-planta transformation strategy for upland cotton (*Gossypium hirsutum*). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*.

2016, **14**(1), 9-18. DOI: 10.1016/j.jgeb.2016.05.003. ISSN 1687157X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1687157X16300105>

- [24] YAN, Lei, Peng CHEN, Shuang ZHANG, Suyue LI, Xiaojuan YAN, Ningbo WANG, Ning LIANG a Hongyu LI. Biotransformation of ferulic acid to vanillin in the packed bed-stirred fermentors. *Scientific Reports*. 2016, **6**(1). DOI: 10.1038/srep34644. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/srep34644>
- [25] FALCONNIER, B., C. LAPIERRE, L. LESAGE-MEESSEN, G. YONNET, P. BRUNERIE, B. COLONNA-CECCALDI, G. CORRIEU a M. ASTHER. Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-937: Identification of metabolic pathways. *Journal of Biotechnology*. 1994, **37**(2), 123-132. DOI: 10.1016/0168-1656(94)90003-5. ISSN 01681656. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168165694900035>
- [26] Wikipedia contributors. (2020, July 22). *Cupriavidus*. In *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. Retrieved 11:38, November 8, 2020, from <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Cupriavidus&oldid=968873010>
- [27] STEINBERG, James P. a Eileen M. BURD. Other Gram-Negative and Gram-Variable Bacilli. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2. Elsevier, 2015, 2015, 2667-2683.e4. ISBN 9781455748013. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4557-4801-3.00238-1
- [28] CHAI, Li-yuan, Huan ZHANG, Wei-chun YANG, Yong-hua ZHU, Zhi-hui YANG, Yu ZHENG a Yue-hui CHEN. Biodegradation of ferulic acid by a newly isolated strain of *Cupriavidus* sp. B-8. *Journal of Central South University*. 2013, **20**(7), 1964-1970. ISSN 2095-2899. Dostupné z: doi:10.1007/s11771-013-1696-3
- [29] Lee JC, Jeon CO, Lim JM, Lee SM, Lee JM, Song SM, Park DJ, Li WJ, Kim CJ. *Halomonas taeanensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005 Sep;55(Pt 5):2027-32.
- [30] Okamoto T.; Maruyama A.; Imura S.; Takeyama H.; Naganuma T. "Comparative Phylogenetic Analyses of *Halomonas variabilis* and Related Organisms Based on 16S rRNA, *gyrB* and *ectBC* Gene Sequences." *Systematic and Applied Microbiology*, Volume 27, Number 3, 1 March 2004, pp. 323-333(11)
- [31] Quillaguamán, J., S. Hashim, F. Bento, B. Mattiasson, and R. Hatti-Kaul. 2005. "Poly(β -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1

using starch hydrolysate as substrate." *Journal of Applied Microbiology*. Jul 2005. Vol. 99(1) 151

- [32] Romano I, Giordano A, Lama L, Nicolaus B, Gambacorta A. "Halomonas campaniensis sp. nov., a haloalkaliphilic bacterium isolated from a mineral pool of Campania Region, Italy." *Syst Appl Microbiol*. 2005 Sep;28(7):610-8.
- [33] 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.aams.2020.07.001
- [34] 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
- [35] 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
- [36] 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
- [37] Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "Hot spring". *Encyclopedia Britannica*, 26 Sep. 2017, <https://www.britannica.com/science/hot-spring>. Accessed 24 June 2021.
- [38] 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

- [39] 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>
- [40] 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.
- [41] 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>
- [42] 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
- [43] 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>
- [44] 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
- [45] 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
- [46] 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>

- [47] SILDARRIAGA-HERNÁNDEZ, Sara, Carolina VELASCO-AYALA, Paulina LEAL-ISLA FLORES, Magdalena DE JESÚS ROSTRO-ALANIS, Roberto PARRA-SALDIVAR, Hafiz M.N. IQBAL a Danay CARRILLO-NIEVES. Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, 161, 1099-1116. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.047
- [48] TANG, Pei Ling a Osman HASSAN. Bioconversion of ferulic acid attained from pineapple peels and pineapple crown leaves into vanillic acid and vanillin by *Aspergillus niger* I-1472. *BMC Chemistry*. 2020, **14**(1). ISSN 2661-801X. Dostupné z: doi:10.1186/s13065-020-0663-y