



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-0302-10

Imobilizačné techniky pre prípravu biokatalyzátorov na priemyselnú produkciu prírodných aróm

Zodpovedný riešiteľ **Ing. Marek Bučko, PhD.**

Príjemca

Chemický ústav Slovenskej akadémie vied

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Chemický ústav Slovenskej akadémie vied
2. Fakulta chemickej a potravinárskej technológy STU
3. Axxence Slovakia s.r.o.
4. Ústav polymérov Slovenskej akadémie vied
5. Medzinárodné laserové centrum

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

1. Lentikat`s a.s., Praha, Česká republika
2. Oddelení elektronové mikroskopie, Ústav prístrojové techniky Akadémie vied České republiky, Brno, Česká republika
- 3.

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

- 1.
- 2.
- 3.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Schenk Mayerová A, Bučko M, Gemeiner P, Treľová D, Lacík I, Chorvát D Jr, Ačai P, Polakovič M, Lipták L, Rebroš M, Rosenberg M, Štefuca V, Neděla V, Tihlaříková E. Physical and bioengineering properties of polyvinyl alcohol lens-shaped particles versus spherical polyelectrolyte complex microcapsules as immobilization matrices for a whole-cell Baeyer-Villiger monooxygenase. Applied Biochemistry and Biotechnology 2014;174: 1834-1849
2. Schenk Mayerová A, Bertóková A, Šefčovičová J, Štefuca V, Bučko M, Vikartovská A, Gemeiner P, Tkáč J, Katrlík J. Whole-cell Gluconobacter oxydans biosensor for 2-phenylethanol biooxidation monitoring. Analytica Chimica Acta 2014, accepted, <http://dx.doi.org/10.1016/J.aca.2014.11.012>

3. Bertokova A, Bertok T, Filip J, Tkac J. Gluconobacter sp. cells for manufacturing of effective electrochemical biosensors and biofuel cells. Chemical Papers 2014, accepted, DOI:10.1515/chempap-2015-0040
4. Rebroš M, Lipták L, Rosenberg M, Bučko M, Gemeiner P. Biocatalysis with Escherichia coli-overexpressing cyclopentanone monooxygenase immobilized in polyvinyl alcohol gel. Letters in Applied Microbiology 2014; 58:556-563
5. Papajová, E., Bujdoš, M., Chorvát, D., Stach, M., Lacík, I. (2012). Method for preparation of planar alginate hydrogels by external gelling using an aerosol of gelling solution. Carbohydrate Polymers, 90, 472–482. DOI:10.1016/j.carbpol.2012.05.067

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky projektu bude spoločnosť Axxence Slovakia s.r.o. využívať v prípade vybudovania fermentačných jednotiek v novovytvorenej prevádzke v Bratislave zameranej na výrobu prírodných aróm. Priamym využitím v takom prípade bude výroba kyseliny fenyloctovej z 2-fenyletanolu, ktorá sa bude obchodovať v čistom stave alebo vo forme esteru - izoamyl fenyloctátu. Nepriamym využitím bude príprava a využitie biokatalyzátorov na báze imobilizovaných buniek a enzýmov metódami zachytenia v polyelektrolytových kapsuliach a časticiach vyvinutých na pracovisku žiadateľa v rámci riešenia projektu. Imobilizácia buniek *G. oxydans* v polyelektrolytových maticiach tiež preukázateľne viedla ku operačnej a skladovacej stabilizácii buniek pri produkcii kyseliny fenyloctovej čo môže byť uplatnené aj pri imobilizácii nových biokatalyzátorov. Bola potvrdená použiteľnosť imobilizátov v polyelektrolytových nosičoch v prototypoch integrovaných laboratórnych systémov s bioreaktormi využiteľnými na produkciu prírodných aróm. Taktiež vývoj pokročilých techník charakterizácie imobilizátov v spolupráci žiadateľa s pracoviskami ÚPo, MLC, FCHPT za spolupráce so skupinou Dr. V. Nedělu (UPT, AV ČR, Brno) môže nájsť uplatnenie pri získavaní nových poznatkov o štruktúre a vlastnostiach imobilizátov zvyčajných v budúcnosti. Princíp konštrukcie nových ampérometrických biosenzorov vyvinutý na pracovisku žiadateľa je uplatniteľný ako technika on-line monitorovania biotechnologických procesov. Výsledkom projektu bol tiež rozvoj techník optickej diagnostiky na sledovanie viability a metabolického stavu baktérií, čo je možné využiť v ďalších biotechnologických aplikáciách. Výskumná skupina z FCHPT rozpracovala imobilizáciu buniek *G. oxydans* na produkciu kyseliny fenyloctovej využitím imobilizácie do polyvinylalkoholového gélu vo forme šošoviek LentiKats, ktoré sú netoxické a rezistentné voči mikrobiálnej degradácii. Výsledky viedli k prehĺbeniu vzájomnej spolupráce s firmou LentiKats a rozšírili poznatky na úrovni aplikácie tejto imobilizačnej techniky pri príprave látok s toxickým a inhibičným účinkom substrátu i produktu na produkčný kmeň. Imobilizácia preukázala okamžitú použiteľnosť imobilizátov a čiastočný ochranný charakter imobilizácie na produkčný kmeň pred negatívnymi účinkami reaktantov. Imobilizácia do LentiKats preukázala vhodnosť tejto techniky aj pre biotechnologickú produkciu aróm. Výsledky projektu budú členovia riešiteľského kolektívu ÚPo SAV využívať v ďalšom výskume týkajúcom sa dizajnovania a charakterizácie vlastností imobilizačných materiálov na báze polymérnych mikrokapsúl a šošoviek vhodných na enkapsuláciu i) buniek v bunkových terapiách, resp. ii) enzýmov v biokatalytických reakciách v rámci biotechnológie.

CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Základný cieľ - vývoj metód imobilizácie a bioreaktora na biokatalytickú oxidáciu 2-fenyletanolu na kyselinu fenyloctovú bol splnený. Na pracovisku žiadateľa CHÚ SAV bola vyvinutá imobilizácia baktérií *Gluconobacter oxydans* do polyelektrolytových komplexov spĺňajúcich nároky na mechanickú a katalytickú stabilitu a vysokú selektivitu biokatalyzátora. Bol tiež vyvinutý biosenzor na monitorovanie produkcie kys. fenyloctovej. Modifikácia imobilizácie umožňuje použiť dostupnejšie a lacnejšie materiály a metódy v porovnaní s pôvodným protokolom vhodnejším pre špeciálne aplikácie. Vyvinutý biokatalyzátor bol použitý na pracovisku Axxence Slovakia s.r.o. v špeciálnom reaktore typu prebublávanej kolóny, v ktorom sa dosiahli v opakovaných šaržiach s postupným prídavkom 2-fenyletanolu

vysoké koncentrácie produktu. Bol tiež vyvinutý spôsob izolácie a purifikácie produktu vhodný pre jeho priemyselnú výrobu založený na extrakcii a rekryštalizácii. Výskumná skupina FCHPT naplnila úlohu vypracovať imobilizáciu produkčného kmeňa do polyvinylalkoholového gélu vo forme LentiKats. Optimalizáciou množstva imobilizovanej biomasy a vplyvu aerácie je možná okamžitá a opakovaná použiteľnosť častíc na maximálnu produkciu kyseliny fenyloctovej, čím sa zvyšuje ekonomický benefit imobilizácie. Pomocou konfokálnej laserovej skenovacej mikroskopie na MLC sme charakterizovali viabilitu buniek *G. oxydans* v závislosti na reakčnom prostredí. Pomocou sledovania endogénnej fluorescence sme študovali ich metabolický oxidatívny stav. Kolektív ÚPo stanovil priepustnosť a distribúciu pórov PEC mikrokapsúl a PVA šošoviek inverznou gélovou permeačnou chromatografiou a navrhol metodiku štúdia PMCG mikrokapsúl a iných typov hydrogélových mikrokapsúl a mikrosfér.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku
(max. 20 riadkov)

The basic objective - the development of immobilization and bioreactor for biocatalytic oxidation of 2-phenylethanol to phenylacetic acid was achieved. Immobilization of *Gluconobacter oxydans* cells in polyelectrolyte complexes with required mechanical, catalytic stability and high selectivity of the biocatalyst was developed at the applicant's workplace. A biosensor for monitoring of phenylacetic acid production was developed. The modification of the immobilization allows the use of more available and cheaper materials and methods compared to the original protocol that was more suitable for special applications. The biocatalyst was used at Axxence Slovakia s.r.o. in a specially designed reactor - bubbled column, in which high concentrations of product was obtained by repeated batches with sequential addition of 2-phenylethanol. Isolation and purification of product for the industrial production based on extraction and recrystallization was developed too. Partners from FCHPT fulfilled the task to develop immobilization of production strain into polyvinylalcohol gel - LentiKats form. Immobilization was optimized in respect to the quantity of immobilized viable biomass and aeration which enabled immediate and repeated use for maximum phenylacetic acid productivity with increased economic benefits. Dependence of *G. oxydans* cell viability on reaction media was characterized at ILC using a confocal laser scanning microscopy. By measuring the endogenous fluorescence, the cell oxidative metabolic state was studied. Team of PI determined permeability and pore distribution of PEC microcapsules and PVA lenses by inverse gel permeation chromatography and suggested the techniques for study of properties of PMCG microcapsules and other hydrogel microcapsules and microspheres.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

Zodpovedný riešiteľ

Ing. Marek Bučko, PhD.

V Bratislave 27. 11. 2014

Štatutárny zástupca príjemcu

Ing. Miroslav Kooš, DrSc.

V Bratislava 27. 11. 2014

.....
podpis zodpovedného riešiteľa

.....
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu