

Záverečná karta projektu

Názov projektu **Enzýmová produkcia prírodných aromatických aditív** Evidenčné číslo projektu **APVV-0061-11**

Zodpovedný riešiteľ **Doc. RNDr. Stanislav Stuchlík, CSc.**
Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Katedra molekulárnej biológie PriFUK
2. Chemický ústav PriFUK
3. Katedra organickej chémie
- 4.
- 5.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

- 1.
- 2.
- 3.

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

1. Oznámenie pôvodcu dňa 7.12.2015 o vytvorení vynálezu "Spôsob biotransformácie trans-2-hexenálu na trans-2-hexenol pomocou rekombinantných enzýmov" - Potvrdenie rektora UK o uplatnení si práva na predmet priemyselného vlastníctva zo dňa 13.1.2015 - patentová prihláška v štádiu dokončenia a následného podania na ÚPV SR
- 2.
- 3.

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

1. Pavol Utekal, Csaba Tóth, Anikó Illéssová, Pavol Koiš, Ján Turňa, Hana Drahovská, Stanislav Stuchlík. Expression of soluble Saccharomyces cerevisiae alcohol dehydrogenase in Escherichia coli applicable to oxido-reduction bioconversions. Biologia 69, 722-726, 2014
2. Po potvrdení prijatia Patentovej prihlášky pripravený manuskript pre zaslanie do SCI časopisu: Levarski, Fraňo, Koiš, Bírová, Turňa, Kubinec, Blaško, Stuchlík - Conversion of trans-2-hexenal to trans-2-hexenol by recombinant alcohol dehydrogenase and formate dehydrogenase produced in E. coli.

3. Zvadová, Z., Bocánová, L., Jiríčková, K., Hopková, D., Stuchlík, S., Koiš, P. Optimalizácia expresie a purifikácie rekombinantnej alkoholdehydrogenázy. Študentská vedecká konferencia PriF UK 2013. Zborník recenzovaných príspevkov [elektronický zdroj]. - Bratislava: Univerzita Komenského, 2013. - ISBN 978-80-223-3392-4. - S. 881-886 [CD-ROM] Študentská vedecká konferencia PriF UK 2013, Bratislava, 24.4.2013. SK

4. Stuchlík, S., Hason, L., Levarski, Z., Bocánová, L., Jiríčková, K., Hopková, D., Koiš, P., Turňa, J. Comparison of activity of immobilized and free recombinant formate dehydrogenase expressed in Escherichia coli. FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, 30.8.-4.9.2014. FR, FEBS Journal 281, Suppl. 1 (2014), s. 654.

5. Levarski, Z., Fraňo, M., Koiš, P., Blaško, J., Kubinec, R., Stuchlíková, M., Turňa, J., Stuchlík, S. Conversion of trans-2-hexenal to trans-2-hexenol using recombinant alcohol and formate dehydrogenases produced in soluble form in Escherichia coli. Recombinant Protein Production [s.l.]: [s.n.], 2015. S. 117,. 8th Conference on Recombinant Protein Production, Mallorca, 22.-24.4.2015. ES

Uplatnenie výsledkov projektu

Budúci odberateľ výsledkov projektu a pripravenej technológie oxido-redukčnej biotransformácie, firma Axxence Slovakia, s.r.o. bude po zaslaní patentovej prihlášky a riešení duševného vlastníctva oslovený podľa Zmluvy o budúcej zmluve zo dňa 14.11.2011.

CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV

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

Pri riešení projektu sme pripravili E.coli producentov rekombinantných enzýmov pre oxido-redukčné biotransformácie: alkoholdehydrogenáza (ADH) a formátdehydrogenáza (FDH). Optimalizovali sme ich produkcie riadenou kultiváciou vo fermentore ako aj ich purifikáciu z hľadiska výťažku a biologickej enzýmovej aktivity (špecifická aktivita ADH=82,5 - 282 U/mg, špecifická aktivita rFDH =7,6 – 11,58 U/mg). U oboch E. coli producentov (ADH aj FDH) dosahujeme úroveň produkcie rádovo 30-40% celkových bunkových proteínov. Táto vysoká expresia umožňuje efektívnu jedнокrokovú chromatografickú purifikáciu (teda ekonomicky efektívnu) oboch aktívnych enzýmov na základe prítomných 6-tich His zvyškov na C koncoch oboch enzýmov. Pri produkcii trans-2-hexenolu biotransformáciou s voľnými rekombinantnými enzýmami rADH a rFDH v mikromeradle sme získali výťažok, ktorý predstavoval 91%-ný podiel trans-2-hexenolu a 9% podiel východiskového trans-2-hexenal. Po zastavení reakcie sa zmes môže oddestilovať, aby sa získal želaný produkt. Pripravili sme amino modifikované magnetické nanočastice pre imobilizáciu rekombinantných enzýmov. rADH a rFDH cez glutaraldehyd. Oba enzýmy sme naviazali na častice tvorené APTES-MNP-SiO₂. Dosiahli sme takmer 60% konverziu v prípade imobilizovanej rADH, resp. 32% v prípade imobilizovanej rFDH. Uskutočnili sme tiež imobilizáciu na sacharidové nosiče (IDA-Sefarózu 4B), kde však stupeň konverzie substrátu bol pod 10%.

Pre odberateľa sme pripravili technologické riešenie biotransformácie trans-2-hexenal na trans-2-hexenol, ktoré umožní spoločnosti jeho efektívnejšiu a ekonomickejšiu produkciu a tým zvýšiť jej konkurencieschopnosť na trhu.

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

In this project, we have prepared E. coli based strains producing recombinant enzymes used in oxidation-reduction reactions: alcohol dehydrogenase (ADH) and formate dehydrogenase (FDH). We have optimized the fermentation conditions and purification steps ensuring high yields and enzymatic activities (specific activity of ADH = 82.5 -282 U/mg, specific activity of FDH 7,6 - 11,58 U/mg). Both E. coli producers are capable of expressing ADH, or FDH respectively, at the level of 30-40% of total cell proteins. High-level expression allows (cost) effective and simple purification by affinity chromatography utilizing 6 histidine residues on C-

termini of both proteins. By employing free in-solution enzymes, we have achieved 91% trans-2-hexenal to trans-2-hexenol conversion rate, with 9% representing the remaining trans-2-hexenal added to reaction. The resulting product is separable by distillation. We have also prepared amino-modified magnetic nano-particles allowing immobilization of the recombinant ADH and FDH using glutaraldehyde. Using APTES-MNP-SiO₂ bound ADH, we were able to transform 59,5% of trans-2-hexenal, while the use of immobilized FDH resulted in 32% conversion. The immobilization of both enzymes on saccharide carriers (IDA-sepharose 4B) resulted in under 10% conversion rate.

We have prepared for our customer the technological solution for biotransformation of trans-2-hexenal to trans-2-hexenol allowing more cost and labor effective production and thus it enables to increase of customer's market competitiveness.

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

Zodpovedný riešiteľ

Doc. RNDr. Stanislav Stuchlík, CSc.

V Bratislave 22.01.2016

Štatutárny zástupca príjemcu

Prof. RNDr. Karol Mičieta, PhD.

V Bratislave 22.01.2015

.....
podpis zodpovedného riešiteľa

.....
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu