

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-15-0466****Príprava prírodných aróm biotransformáciami s využitím komprehenzívnych analytických metód**Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Róbert Kubinec, CSc.**Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave - Prírodovedecká fakulta****Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený**Chemický ústav a Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave
firma Axxence Slovakia, s.r.o.**Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení**

Prírodovedecká fakulta Univerzity Karlovy, Katedra analytické chemie, Praha, Česká republika

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektuGabrišová Ľ., Peciar P., Kubinec R., Slovenská technická univerzita v Bratislave a Univerzita Komenského v Bratislave, číslo prihlášky patentu: 50055-2018, Zariadenie na zakoncentrovanie prchavých organických zlúčenín adsorpciou a desorpciou a spôsob zakoncentrovania prchavých organických zlúčenín adsorpciou a desorpciou. podaná patentová prihláška
Úžitkový vzor č. 8574, Zakoncentrovanie prchavých organických zlúčenín adsorpciou a desorpciou, udelený 13.9.2019. Autori: Gabrišová Ľ., Peciar P., Kubinec R., Slovenská technická univerzita v Bratislave a Univerzita Komenského v Bratislave**Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače**

1. Kormanová, Ľ., Rybecká, S., Levarski, L., Struhárňanská, E., Levarská, L., Blaško, J., Turňa, J., Stuchlík, S. 2020. Comparison of simple expression procedures in novel expression host *Vibrio natriegens* and established *Escherichia coli* system. *Journal of Biotechnology* 321: 57-67
2. Kubinec, R., Blaško, J., Galbavá, P., Jurdáková, H., Sadecká, J. Pangallo, D., Bučková, M., Puškárová, A. 2020. The antifungal activity of vapour phase of odourless thymol derivate. *PeerJ* 8, e9601.
3. Levarski, Z., Fraňo, M., Bírová, S., Struhárňanská, E., Blaško, J., Kubinec, R., Koiš, P., Turňa, J., Stuchlík, S. 2018. Small scale biotransformation of food additive trans-2-hexenal to trans-2-hexenol by recombinant alcohol dehydrogenase and formate dehydrogenase produced in *Escherichia coli*. *Journal of Food and Nutrition Research*, 57(2): 201-207.
4. Kubinec, R., Kotora, P., Ferenczy, V., Blaško, J., Podolec, P., Hengerics Szabó, A., Behulová, D., Bierhanzl, V., Čabala, R., Stuchlík, S., Filipiak, W., Thang, N. M. 2018. Simultaneous analysis of carbohydrates, polyols and amines in urine samples using

chemical ionization gas chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 41(2): 449-458.

5. Struhárňanská E., Chovanová, M., Rybecká, S., Mikulášová, M., Levarski, Z., Zámocký, M., Turňa, J., Stuchlík, S. 2019. Evaluation of thermostable catalase-peroxidase AfKatG supplementation on toxicity of residual hydrogen peroxide in cultivation media of lactic acid bacteria from starter cultures. *General Physiology and Biophysics* 38(5): 455-460.

6. Szabóová, Z., Blaško, J., Galbavá, P., Nižnanský, L., Górová, R., Filipiak, W., Musil, K., Čabala, R., Gabrišová, L., Peciar, M., Kubinec, R. 2018. Analysis of triglycerides in butter, plant oils, and adulterated butter with LPGC-MS. *Monatshefte Fur Chemie*, 149(9): 1573-1578.

7. Galbavá, P., Kubinec, R., Szabóová, Z., Blaško, J., Gabrišová, L., Macho, O., Čabala, R., Stuchlík, S., Filipiak, W., Thang, N. M. 2018. GC-MS analysis of waxes in candle without chromatographic separations. *Monatshefte Fur Chemie*, 149(9): 1543-1548.

8. Szabóová, Z., Galbavá, P., Hengerics Szabó, A., Cigáň, M., Nižnanský, L., Kubinec, R., Blaško, J. 2017. GC-MS/MS method for age determination of fingerprints. *Monatshefte für Chemie*. 148(9): 1673-1678

9. Galbavá, P., Szabóová, Z., Hengerics Szabó, A., Gabrišová, L., Peciar, P., Zigo, P., Kubinec, R., Blaško, J. 2017. The analysis of polar compounds in cigarette ashes by GC-MS/MS. *Monatshefte für Chemie*. 148(9): 1667-1671.

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky získané počas riešenia projektu majú uplatnenie v praxi v troch oblastiach.

- Novo vyvinuté komprehenzívne analytické metódy možno použiť pri všetkých postupoch analýz potrebných pri sledovaní procesov biotransformácie vonných látok.

- Novo vyvinuté postupy izolácie prchavých látok z média po biotransformácií je možné použiť nielen na izoláciu vonných látok firmou Axxence Slovakia, s.r.o., ale aj pri iných typoch analytov (napr. alkoholu). Táto metóda je zvlášť výhodná pri získavaní analytov nachádzajúcich sa v médiu pri nízkych koncentráciách, kde doteraz používané postupy sú už ekonomicky nevýhodne.

- S vyvinutým postupom a technológiou enzýmovej oxido-redukčnej biotransformácie vonných látok bude oslovený spoluriešiteľ projektu firma Axxence Slovakia, s.r.o., bude oslovená podľa Zmluvy o budúcej zmluve Z-UKPRIF-2015-355 z 9.11.2015.

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

V rámci riešenia projektu boli vyvinuté komprehenzívne analytické metódy umožňujúce analýzy všetkých relevantných parametrov potrebných na sledovanie procesu biotransformácie vonných látok. Vyvinuli sa tiež nové technológie, umožňujúce získavať vonné látky z média po biotransformácií s výraznou úsporou energie a pri nižších teplotách ako doteraz používané technológie. Na tieto technológie bol pridelený úžitkový vzor a bola podaná patentová prihláška. Ďalším výsledkom riešenia projektu zameraného na biotransformácie vonných látok je pripravená technológia produkcie rekombinantného enzýmu RrADH a overenie jeho použitia na biokonverziu acetofenónu na 1-fenyletanol. Ku hlavným prínosom riešenia projektu preto patria poznatky a postupy, ktoré po preverení technológie v poloprevádzke umožnia vývoj a realizáciu biotransformácie uvedených, ale potenciálne aj ďalších príbuzných látok vyvinutým enzýmovým oxido-redukčným systémom v spoluriešiteľskej firme Axxence Slovakia, s.r.o.. Efektívnou purifikáciou RrADH pomocou IMAC FPLC chromatografie a v prostredí trehalózy ako solubilizačného faktora, sa stanovili objemové ako aj špecifické aktivity purifikovaných enzýmov. Uskutočnili sa biotransformácie acetofenónu na 1-fenyletanol v dvojenzýmovom systéme. Pomocou novo vyvinutých komprehenzívnych analytických metód sa stanovili výsledky biotransformácie, pri 87% miere konverzie, predstavoval výsledný produkt až 99,9% požadovaného S-izoméru 1-fenyletanolu, čo potvrdzuje vysokú enantiošpecifickú biokonverziu. Uskutočnili sa tiež biotransformácie trans-2-hexenálu na trans-2-hexenol s imobilizovými enzýmami rScADH a rCbFDH na Ni chelátovom Eupergite CM a získala sa až 88% konverzia cieľového produktu.

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

As part of the project solution, comprehensive analytical methods were developed that enable the analysis of all relevant parameters needed to monitor the process of natural flavours biotransformation. New technologies have also been developed, enabling the extraction of natural flavours from the medium after biotransformation with significant energy savings and at lower temperatures than previously used technologies. The utility model has been assigned to these technologies and a patent application has been filed. Another result of the project focused on natural flavours biotransformations is the prepared technology for the production of the recombinant enzyme RrADH and verification of its use for the bioconversion of acetophenone to 1-phenylethanol. Therefore, the main benefits of the project include knowledge and procedures that, after testing the technology in pilot plant, will enable the development and implementation of biotransformation of these substances, but also potentially related substances developed by enzyme oxidation-reduction system in the co-research company Axxence Slovakia. By FPLC and in the trehalose environment, the volume as well as specific activities of the purified enzymes were determined. Biotransformations of acetophenone to 1-phenylethanol were performed in a two-enzyme system. Using newly developed comprehensive analytical methods, the results of biotransformation were determined, at 87% conversion, the final product represented up to 99.9% of the desired S-isomer of 1-phenylethanol, which confirms the high enantiospecific bioconversion. Biotransformations of trans-2-hexenal to trans-2-hexenol with the immobilization enzymes on sorbent were also performed to give up to 88% conversion of the target product.