

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-16-0314****Výskum a vývoj priemyselných biokatalyzátorov na prípravu špeciálnych biochemikálií**Zodpovedný riešiteľ **prof. Ing. Michal Rosenberg, PhD.**Príjemca **Slovenská technická univerzita v Bratislave - Fakulta chemickej a potravinárskej technológie**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Ústav biotechnológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie Slovenskej technickej univerzity v Bratislave

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Nespolupracovalo sa so žiadnym zahraničným pracoviskom.

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

Zverejnená prihláška patentu 50042-2018. Názov: Spôsob prípravy alfa-anoméru aromatických glykozidov. Pôvodcovia: Hronská, H., Rosenberg, M., Višňovský, J. Dátum zverejnenia prihlášky: 02.04.2020.

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

Dolejš, I., Stloukal, R., Rosenberg, M., Rebroš, M.: Nitrogen removal by co-immobilised anammox and ammonia-oxidising bacteria in wastewater treatment. Catalysts (2019), 9, 523; doi:10.3390/catal9060523

Batel Deri-Zenaty, Shani Bachar, Martin Rebroš, Ayelet Fishman: A coupled enzymatic reaction of tyrosinase and glucose dehydrogenase for the production of hydroxytyrosol. Applied Microbiology and Biotechnology, (2020) 104(11), pp. 4945-4955

Garajová, N., Ondrejková, E. (Pokorná), Hronská, H.: Vplyv kultivačných podmienok na mikrobiálnu produkciu hexóزامinidáz. In Chémia a technológie pre život [elektronický zdroj]: 21. celoslovenská študentská vedecká konferencia s medzinárodnou účasťou. Bratislava, 6. 11. 2019. 1. vyd. Bratislava : Slovenská chemická knižnica, 2019, S. 173-173. ISBN 978-80-8208-015-8.

Hegyí, Z., Rebroš, M.: Tools for improvement of enzymatic stability and activity in Escherichia coli. In: Book of abstracts, RPP10 A comparative view on host physiology, 24-27 april 2019, Crete, Greece; S 125

Krasňan, V., Rebroš, M.: Upscale of high-cell density production of recombinant proteins by E. coli In: Book of abstracts, RPP10 A comparative view on host physiology, 24-27 april 2019, Crete, Greece; S 121

Markošová, K., Křen, V., Rosenberg, M., Rebroš, M.: Upscale of Pichia pastoris fermentation. In: Book of abstracts, RPP10 A comparative view on host physiology, 24-27 april 2019, Crete, Greece; S 120

Kavčiaková, K., Gyuranová, D., Rebroš, M.: Rekombinantné enzýmy s potenciálnym priemyselným využitím. In Chémia a technológie pre život [elektronický zdroj]: 22. celoslovenská študentská vedecká konferencia s medzinárodnou účasťou. Bratislava, 25. 11. 2020. 1. vyd. Bratislava: Slovenská chemická knižnica, 2020, S. 129-130. ISBN 978-80-8208-042-4.

Bláhová, M., Ondrejková, E. (Pokorná), Hronská, H.: Katalytická aktivita vybraných hexóزامinidáz. In Chémia a technológie pre život [elektronický zdroj]: 22. celoslovenská študentská vedecká konferencia s medzinárodnou účasťou. Bratislava, 25. 11. 2020. 1. vyd. Bratislava: Slovenská chemická knižnica, 2020, S. 125-126. ISBN 978-80-8208-042-4.

Uplatnenie výsledkov projektu

Na základe výsledkov projektu možno vyrábať celý rad chromogénnych a fluorogénnych substrátov enzýmov zo skupiny glykozidáz. Chromogénne a fluorogénne substráty sa využívajú úspešne v klinickej diagnostike na detekciu aktivity špecifických enzýmov slúžiacich na zisťovanie prítomnosti a diferenciaciu baktérií. Jedným z najviac preštudovaných a využívaných postupov v tejto oblasti je stanovenie α -amylázy v moči, ktoré sa využíva na diagnostiku ochorenia pankreasu. Ďalšou skupinou sú enzýmy, ktoré sa dajú stanoviť pomocou chromogénnych či fluorogénnych substrátov galaktozidázy, čo je užitočné napr. pri rýchlejšej detekcii koliformných baktérií a na odlišenie streptokokov a enterokokov. Výroba uvedených látok sa bude realizovať prostredníctvom spolupráce s firmou SynthCluster, s.r.o.

Druhou skupinou látok, ktoré je možné pripravovať na základe výsledkov projektu, sú tzv. zelené arómy, ktoré sa uplatňujú v priemysle prírodných aróm. Produkty tohto priemyslu smerujú majoritne do potravinárskeho, ale aj kozmetického priemyslu. Typickými predstaviteľmi sú trans-2-hexenál a trans-2-hexenol. Výroba uvedených látok sa bude realizovať prostredníctvom spolupráce s firmou Axxence Slovakia s.r.o.

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

V priebehu riešenia projektu boli vypracované biokatalyzátory a postupy prípravy celkovo 12 α -anomérov glykozidov, ktoré slúžia ako špecifické substráty na detekciu a stanovenie aktivity hydroláz. Podstatou navrhnutého výrobného postupu je izolácia α -anomérov zo zmesi glykozidov enzymovou hydrolýzou nežiadúcich anomérov s následnými izolačnými krokmi. Na základe získaných výsledkov boli vyšpecifikované 4 základné produkty, ktoré môžu ísť priamo do výroby:

- 4-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galaktopyranozid
- 2-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galaktopyranozid
- 2-chlóro-4-nitrofenyl- α -D-galaktopyranozid
- 4-metylumbeliferyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galaktopyranozid

Druhou oblasťou, ktorou sa projekt zaoberal, bola príprava biokatalyzátorov na prípravu prírodných aróm zo skupiny oxylipínov, konkrétne lipoxygenázy a hydroperoxidlyázy. Selekcia génu na prípravu LOX bola uskutočnená metódou „genome mining“ a vybraný gén pre LOX pochádzal z organizmu *Pseudomonas aeruginosa*. Gén bol pripravený synteticky a kodón-optimalizovaný pre produkciu enzýmu v *Escherichia coli*. Gén pre hydroperoxid lyázu v tomto projekte pochádzal z rastliny *Psidium guajava*. Gén bol pripravený synteticky a jeho kodóny boli optimalizované pre rekombinantnú produkciu v baktérii *E. coli*. Výsledkom riešenia bola navrhnutá a overená technológia prípravy trans-2-hexenálu na štvrt'prevádzkových zariadeniach.

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

During the project, biocatalysts and procedures for the preparation of 12 α -anomers of glycosides were developed. The glycosides will serve as specific substrates for the detection and determination of hydrolase activity. The essence of the proposed production process is the isolation of α -anomers from a mixture of glycosides by enzymatic hydrolysis of undesired anomers, followed by isolation steps. Based on the obtained results, 4 basic products were specified, which can go directly to production:

- 4-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside
- 2-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside

- 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside
- 4-methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside .

The second area the project was focused on was the preparation of biocatalysts for the production of natural aromas from the group of oxylipins, namely lipoxygenase and hydroperoxid lyase. The selection of the gene for LOX preparation was performed by the "genome mining" method and the selected gene for LOX came from the organism *Pseudomonas aeruginosa*. The gene was prepared synthetically and codon-optimized for enzyme production in *Escherichia coli*. The hydroperoxide lyase gene in this project was derived from the plant *Psidium guajava*. The gene was prepared synthetically, and its codons were optimized for recombinant production in *E. coli*. Based on the project results technology for the preparation of trans-2-hexenal in was designed and validated at semi-pilot scale.