



Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-17-0333**

Výskum a vývoj efektívnych procesov prípravy vanilínu a iných prírodných aróm s využitím oxidačného a protektívneho účinku rekombinantnej katalázy a peroxidázy

Zodpovedný riešiteľ **doc. RNDr. Stanislav Stuchlík, CSc.**

Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave - Vedecký park**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Šafárikovo námestie 6, 81499 Bratislava

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Šafárikovo námestie 6, 81499 Bratislava

Slovenská technická univerzita, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava

Ústav molekulárnej biológie SAV, Dúbravská cesta 21, 84551 Bratislava

Axxence Slovakia s.r.o., Mickiewiczova 2245/7, 811 07 Bratislava

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Na riešení projektu sa nepodieľalo zahraničné pracovisko.

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

Patentová prihláška: Stuchlík, S., Levarski, Z., Kormanová, L., Turňa, J. Spôsob navýšenia permeability vonkajších bunkových štruktúr u *Vibria natriegens* z pohľadu extracelulárneho transportu rekombinantných proteínov. PP 50063-2021, 06.12.2021, Úrad priemyselného vlastníctva SR. Na základe uvedenej patentovej prihlášky bola pripravená medzinárodná PCT prihláška a podaná bude do konca roku 2022.

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

1. Chovanová, K., Kamlárová, A., Maresch, D., Harichová, J., Zámocký, M. (2019) Expression of extracellular peroxidases and catalases in mesophilic and thermophilic *Chaetomia* in response to environmental oxidative stress stimuli. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 181:481-490. (IF = 4,527)
2. Kormanová, L., Rybecká, S., Levarski, Z., Struhárňanská, E., Levarská, L., Blaško, J., Turňa, J., Stuchlík, S. Comparison of simple expression procedures in novel expression host *Vibrio natriegens* and established *Escherichia coli* system. *Journal of Biotechnology* 321: 57-67, 2020 (IF = 3,307)
3. Chovanova, K., Bohmer, M., Poljovka, A., Budis, J., Harichova, J., Szemes, T., Zámocky, M. (2020) Parallel Molecular Evolution of Catalases and Superoxide Dismutases - Focus on Thermophilic Fungal Genomes. *Antioxidants (Basel)* 9 (11): E1047, 2020 (IF = 6,313)
4. Varga, V., Štefuca, V., Mihálová, L., Levarski, Z., Struhárňanská, E., Blaško, J., Kubinec,

- R., Farkaš, P., Sitkey, V., Turňa, J., Rosenberg, M., Stuchlík, S. Recombinant enzymatic redox systems for preparation of aroma compounds by biotransformation. *Frontiers in Microbiology*, 12: 684640, 2021 (IF=5,64)
5. Vávrová, S., Struhárňanská, E., Turňa, J., Stuchlík, S. The tellurium, a rare element with influence on prokaryotic and eukaryotic biological systems. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (11), 5924; 2021 (IF= 6,208)
6. Minich A., Šarkanová J., Levarski Z., Stuchlík, S. In silico enhancement of solubility of recombinant alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus ruber*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 38: 214, 2022 (IF= 4,253)
7. Minich A., Levarski Z., Mikulášová M., Straka, M., Liptáková, A., Stuchlík, S. Complex analysis of vanillin and syringic acid as natural antimicrobial agents against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* 23, art. No. 1816, 2022 (IF= 6,208)
8. Minich, A., Lišková, V., Kormanová, L., Krahulec, J., Šarkanová, J., Mikulášová, M., Levarski, Z., Stuchlík, S.. Role of RNAIII in resistance to antibiotics and antimicrobial agents in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* 23: art No. 11094, 2022 (IF= 6,208)

Uplatnenie výsledkov projektu

Firma Axxence Slovakia, s.r.o. ako spoluriešiteľ projektu a súčasne budúci odberateľ výsledkov projektu, ktorým je pripravená technológia prípravy vanilínu s využitím rekombinantných enzýmov, bude oslovená podľa Zmluvy o budúcej zmluve zo dňa 30.11.2017.

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

Hlavným cieľom projektu bol rozvoj procesov založených na biokatalytickom pôsobení peroxidáz pri príprave prírodných aróm s užším zameraním na oxidáciu a štiepenie dvojitých väzieb, za vzniku aldehydickej alebo karboxylovej skupiny (napr. príprava vanilínu z eugenolu alebo izoeugenolu). Pri riešení projektu sme uskutočnili nasledovné experimenty: 1. design rekombinantných peroxidáz s enzýmovou špecificitou pre oxidáciu dvojitej väzby, pričom sme vybrali nový enzým, Mn²⁺ závislú lignínperoxidázu DypB z baktérie *Rhodococcus jostii*. 2. stanovili sme optimálne podmienky produkcie DypB s výťažkom 0,5±0,1 g z 1l LB média, 3. stanovili sme optimálne podmienky purifikácie rekombinantne produkovaného DypB, 4. určili sme peroxidázovú aktivitu a stanovili pH optimum pre DypB, 5. stanovili sme optimálne podmienky pre biotransformáciu eugenolu/izoeugenolu na vanilín charakterizované predovšetkým koncentráciou substrátu, parc. tlakom kyslíka, koncentráciou enzýmu a teplotou, 6. experimenty na ÚMB SAV ukázali, že popri katalázach-peroxidázach je do budúca na konverzie substrátov na vanilín možné použiť aj iné hémové peroxidázy z príbuzných rodín, 7. v Axxence Slovakia s.r.o. sa uskutočnil výskum zameraný na testovanie vhodných nosičov na imobilizáciu enzýmov, kde sa ukázalo ako potenciálne výhodné použitie nosičov odvodených z derivátov metakrylátu (Lifetech). Získaným výsledkom riešenia projektu je pripravená technológia produkcie vanilínu biotransformáciou eugenolu/izoeugenolu približne so 45 % mierou konverzie pomocou DypB enzýmu. Súčasne sme pripravili postupy, ktoré umožnia vývoj a realizáciu biotech. produkcie vanilínu odberateľom výsledkov v Axxence Slovakia s.r.o.

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

The main goal of the project was the development of processes based on the biocatalytic action of peroxidases in the preparation of natural aromas with a focus on the oxidation and cleavage of double bonds, resulting in the formation of an aldehyde or carboxyl group (e.g. preparation of vanillin from eugenol or isoeugenol). When solving the project, we carried out the following experiments: 1. the design of recomb. peroxidases with enzyme specificity for the oxidation of the double bond, while we selected a new enzyme, the Mn²⁺-dependent lignin peroxidase DypB from the bacterium *Rhodococcus jostii*. 2. we determined the optimal conditions for the production of DypB with a yield of 0.5±0.1 g per 1L of LB medium, 3. we determined the optimal conditions for the purification of recomb. produced DypB, 4. we determined the peroxidase activity and determined the pH optimum for DypB, 5. we determined optimal conditions for biotransformation of eugenol/iseoeugenol to vanillin characterized primarily by substrate concentration, parc. oxygen pressure, enzyme

concentration and temperature, 6. experiments at IMB SAS showed that, in addition to catalases-peroxidases, it is possible to use other heme peroxidases from related families in the future for the conversion of substrates to vanillin, 7. in Axxence Slovakia s.r.o. research was conducted to test suitable carriers for enzyme immobilization, where the use of resins derived from methacrylate (Lifetech) was shown to be potentially advantageous. The obtained result of the project is prepared technology for the production of vanillin by eugenol/ isoeugenol biotransformation with conversion ratio cca 45 % with DypB enzyme. We have also prepared procedures that will enable the implementation of biotech production of vanillin by the customer of the results in Axxence Slovakia s.r.o.