

DOMINIK SZWAJGIER, ZDZISŁAW TARGOŃSKI

CHARAKTERYSTYKA ENZYMÓW POCHODZENIA MIKROBIOLOGICZNEGO BIORĄCYCH UDZIAŁ W DEGRADACJI ARABINOKSYLANÓW I ICH ROLA W POZYSKIWANIU KWASU FERULOWEGO Z WYSŁODZIN PIWOWARSKICH

Streszczenie

Celem pracy było scharakteryzowanie enzymów pochodzenia bakteryjnego i grzybowego biorących udział w degradacji arabinoksylianów. W szczególności scharakteryzowano esterazy kwasu ferulowego, ksylanazy i acetyloesterazy. Przedstawiono stan badań nad pozyskiwaniem kwasu ferulowego z wysłodzin piwowskich i innych materiałów roślinnych, po zastosowaniu oczyszczonych enzymów lub preparatów enzymatycznych pochodzenia mikrobiologicznego. Wysłodziny piwowskie są najcenniejszym produktem odpadowym przemysłu piwowskiego, bogatym w cenne składniki żywienia, np. białko, błonnik pokarmowy i kwasy tłuszczowe. Kwas ferulowy jest naturalnym, silnym przeciwutleniaczem występującym pospolicie w ziarniakach roślin *Graminaceae* i w produktach ubocznych przemysłu piwowskiego – w wysłodzinach piwowskich. Może być on przekształcany na drodze mikrobiologicznej do innych związków wykorzystywanych przemysłowo, np. przeciwutleniacza kwasu kawowego lub waniliny, cenionego związku aromatycznego żywności.

Słowa kluczowe: kwas ferulowy, esteraza kwasu ferulowego, ksylanaza, acetyloesteraza, wysłodziny, piwo

Wstęp

Wysłodziny powstające w czasie zacierania słodu są najcenniejszym ubocznym produktem przemysłu piwowskiego. Od wielu lat trwają prace nad ich przemysłowym wykorzystaniem. Materiał ten zawiera cenne składniki żywienia, takie jak białko, błonnik pokarmowy i kwasy tłuszczowe. Przeciętny skład wysłodzin, w odniesieniu do suchej masy, jest następujący: 20–30% arabinoksylianów, ok. 44% innych polisacharydów nieskrobiowych i ok. 24% białka. Inne składniki wysłodzin występujące w mniejszych ilościach to: celuloza (17%), lipidy (6%), ligniny (4%), związki mineralne i niewielkie ilości skrobi (< 2%) [1]. Podany przeciętny skład wysłodzin jest zmienny i zależny m.in. od przebiegu procesu zacierania słodu i od

gatunku s ładu [53]. Arabinoksylany występujące w wysłodzinach występują w formie łańcuchów β -1,4-ksylanopiranozowych, w których reszty ksylozowe podstawione są przez reszty arabinozowe w pozycji C2 (około 17% reszt ksylopiranozowych), C3 (7% reszt ksylopiranozowych) lub też w obu pozycjach (około 16% reszt ksylopiranozowych). Większość reszt α -L-arabinofuranozowych występuje w formie monomerowych łańcuchów bocznych, podczas gdy niewielka ich liczba tworzy krótkie łańcuchy boczne według schematu Araf-Araf-Xylp-Araf [52]. Reszty kwasu ferulowego tworzą wiązanie estrowe z grupą arabinofuranozydową w pozycji 5-O [46]. Przeciętna zawartość kwasu ferulowego w wysłodzinach wynosi około 0,32% suchej masy. Od wielu lat poszukuje się jak najlepszych i najwydajniejszych sposobów na zagospodarowanie przemysłowe wysłodzin. Wynikiem tych prac jest duża liczba patentów dotyczących tej problematyki. Ważnym sposobem zagospodarowania wysłodzin jest wykorzystywanie ich jako paszy [44]. Inne kierunki zagospodarowania to wytwarzanie z wysłodzin preparatów odżywczych o dużej zawartości przyswajalnego białka [31, 32, 33] oraz wytwarzanie biogazu [16].

Celem przeglądu było przedstawienie stanu badań nad pozyskiwaniem kwasu ferulowego z wysłodzin piwowarskich po zastosowaniu oczyszczonych enzymów lub preparatów enzymatycznych pochodzenia mikrobiologicznego, jak również scharakteryzowanie enzymów grzybowych i bakteryjnych wykazujących aktywność hydrolityczną w stosunku do polisacharydów nieskrobiowych.

Charakterystyka enzymów pochodzenia mikrobiologicznego biorących udział w degradacji polisacharydów nieskrobiowych

W wielu pracach badawczych, w ciągu ostatnich kilkadziesiąt lat, scharakteryzowano aktywność esterazy kwasu ferulowego, acetyloesterazy i ksylanazy produkowanych przez szczepy różnych drobnoustrojów. Wymienione enzymy są wytwarzane przez drobnoustroje w celu degradacji hemiceluloz wchodzących w skład ścian komórkowych roślin wyższych. Esterazy pochodzenia mikrobiologicznego zwiększają stopień degradacji głównych łańcuchów polisacharydowych ściany komórkowej poprzez usuwanie bocznych grup, które chronią dostęp do łańcucha głównego.

Zastosowanie oczyszczonej ksylanazy lub esterazy kwasu ferulowego w czasie przerobu wysłodzin wiąże się ze znacznie podwyższonymi kosztami. Wykorzystanie mikrobiologicznych preparatów enzymatycznych o wielokierunkowej aktywności w stosunku do frakcji hemicelulozowych umożliwia obniżenie kosztów ich użycia i uzyskiwania cennych półproduktów wykorzystywanych przemysłowo, takich jak kwas ferulowy [6]. Przykładowo, badano zdolność preparatów enzymatycznych Ultraflo, Viscozyme, Termamyl i Lallzyme do uwalniania kwasu ferulowego i kumarowego z wysłodzin piwowarskich [8]. Spośród czterech wymienionych preparatów enzymatycznych, jedynie preparat Termamyl nie wykazywał aktywności esterazy kwasu ferulowego. Preparat Ultraflo najskuteczniej uwalniał wolny kwas

ferulowy i kumarowy w stężeniu wynoszącym odpowiednio 70% wolnego kwasu ferulowego i 8% p-kumarowego w odniesieniu do całkowitej zawartości tych kwasów w wysłodzinach poddanych doświadczeniu. Preparaty Viscozyme i Lallzyme uwolniły w tych samych warunkach odpowiednio 33 i 55% kwasu ferulowego. Preparat Ultraflo L, przejawiający głównie aktywność β -glukanazy oraz wiele pobocznych aktywności hemicelulaz produkowanych przez *Humicola insolens* wykazywał aktywność esterazy kwasu ferulowego w stosunku do metylowych pochodnych kwasu cynamonowego i miał zdolność uwalniania 65% kwasu ferulowego obecnego w formie monomeru oraz trzech form kwasu dehydrodiferulowego z wysłodzin browarniczych [23]. Zastosowanie preparatu Ultraflo L nie wykazującego aktywności esterazy kwasu ferulowego znacznie podnosiło zdolność (z 23 do 47%) oczyszczonej esterazy kwasu ferulowego wyprodukowanej przez grzyby *Aspergillus niger* do uwalniania kwasu ferulowego z młóta browarniczego, zwłaszcza w formie 8,5'-benzofuranowej. Współdziałanie preparatu Ultraflo L i esterazy kwasu ferulowego nie powodowało uwolnienia całej zawartości kwasu ferulowego z wiązań estrowych, co sugeruje, że do uwolnienia dimerowych form kwasu ferulowego w arabinoksylianach z wysłodzin piwowarskich niezbędny jest kompleks enzymatyczny o bogatej aktywności hydrolaz. Możliwe także, że należy zwiększyć dostępność enzymów do reszt kwasu ferulowego, rozmieszczonych w łańcuchu polisacharydów nieskrobiowych. W innych badaniach wykorzystywano 9 handlowych preparatów enzymatycznych firmy Novo Nordisk w celu uwalniania kwasu ferulowego, ramnozy, arabinozy i kwasu galakturonowego z wysłodków buraczanych [38]. Preparaty enzymatyczne, wytworzone przy użyciu szczepów z gatunków *Aspergillus: aculeatus, niger, oryzae* oraz rodzaju *Trichoderma*, wykazywały aktywności hydrolityczne w stosunku do frakcji pektyn, ksylanów, celulozy, β -glukanów, hemiceluloz i arabinanów zawartych w wysłodkach buraczanych. Preparat enzymatyczny SP 342 uwalniał kwas ferulowy w formie wolnej w pierwszych etapach procesu, podczas gdy w następnych godzinach procesu uwalniał kwas ferulowy w formie estrów z sacharydami. Dwa inne preparaty enzymatyczne o nazwach Glucanex i SP 506 uwalniały wolny kwas ferulowy, zaś pozostałe 6 preparatów enzymatycznych nie uwalniało kwasu ferulowego w formie wolnej. Wszystkie preparaty enzymatyczne były zdolne do zwiększenia stężenia w roztworze kwasu ferulowego związanego z sacharydami, przy czym najwyższą aktywnością charakteryzowały się preparaty SP 584, SP 585 i SP 342, przy czym preparat SP 584 uwalniał w formie wolnej około 43% całkowitej zawartości kwasu ferulowego. Preparat Pektolase LM uwalniał najpierw związany estrowo kwas ferulowy, a następnie wolny kwas ferulowy. Preparat SP 342 powodował jednoczesny wzrost stężenia wolnego i związanego kwasu ferulowego w mieszaninie inkubacyjnej, co świadczyło o zdolności enzymów zawartych w tym preparacie do degradacji łańcuchów pektynowych w formie natywnej. Preparat enzymatyczny SP 342 nie był jednak zdolny do uwalniania kwasu ferulowego z niskocząsteczkowych substratów powstałych po działaniu preparatów SP 584 i SP 585. Preparat enzymatyczny SP 584 wykazał ponadto zdolność do uwalniania dehydrodimerów kwasu fenolowego. Wyniki przedstawionych

doświadczeń świadczą o możliwości wykorzystania opisanych grzybowych preparatów enzymatycznych w celu uwalniania kwasu ferulowego w formie połączeń z estrami z wysłodzin piwowarskich.

W badaniach nad uwalnianiem kwasu ferulowego z wysłodzin [14] uzyskano wysokie stężenie kwasu ferulowego w roztworze, sięgające 1,712 g w 1 kg s.m. wysłodzin, co stanowiło 80% całkowitej zawartości kwasu ferulowego w wysłodzinach użytych do badań. Autorzy podkreślili, że najlepsze rezultaty osiągnięto przy użyciu preparatu enzymatycznego Ultraflo L. Maceracja wysłodzin za pomocą wodnych roztworów etanolu nie zwiększała stopnia uwalniania kwasu ferulowego z wysłodzin, zaś autorzy stwierdzili, że możliwe jest uwolnienie nawet do 80% całkowitej zawartości kwasu ferulowego z wysłodzin bez stosowania etapów przygotowawczych młóta. W innych pracach także szczegółowo opisano współpracę ksyłanazy z grzyba rodzaju *Trichoderma* i esterazy kwasu ferulowego ze szczepu *A. niger* w uwalnianiu kwasu ferulowego w formie wolnej z otrąb zbożowych i odpadów buraka cukrowego bogatych w hemicelulozy [22]. Podatność arabinoksyłanów na degradację pod wpływem egzogennej, oczyszczonej endo- β -1,4-ksyłanazy (E.C 3.2.1.8) z *Aspergillus awamori* jest ściśle uzależniona od stosunku zawartości arabinozy do ksylozy w cząsteczce. Jeśli stosunek ten wynosi około 0,4, cząsteczki arabinoksyłanów ulegają łatwo hydrolizie, jeśli natomiast wynosi 0,9 zachodzi bardzo ograniczona degradacja. Należy podkreślić, że w obu przypadkach, niezależnie od omawianego stosunku arabinoza : ksyloza, powstają podobne krótkołańcuchowe fragmenty oligoarabinoksyłanów. Wyniki metylacji krótkołańcuchowych fragmentów oligoarabinoksyłanów wskazują, że 55% reszt ksylopiranozowych w jęczmieniu oraz 65% reszt ksylopiranozowych w słodzie występuje w połączeniach z resztami arabinofuranozowymi [54]. W porównaniu z arabinoksyłanami jęczmienia i słodu, które nie zostały poddane działaniu endoksyłanazy, uzyskane oligoarabinoksyłany charakteryzowały się wyższym stopniem podstawienia reszt ksylopiranozowych przez arabinofuranozę w pozycji O-2 i O-2,3. Powtórna inkubacja otrzymanych oligoarabinoksyłanów z endoksyłaną wyprodukowaną przez grzyby *Aspergillus awamori* nie wywoływała dalszej hydrolizy cząsteczek. Może to wskazywać na fakt odcinania dostępu do łańcuchów oligoksylopiranozowych przez obecność dużej liczby przyłączonych reszt arabinofuranozowych i możliwej obecności reszt kwasu ferulowego. Ograniczona hydroliza oligoarabinoksyłanów przez endo- β -1,4-ksyłanazę wyprodukowaną przez szczep *Aspergillus awamori* może być wyjaśniona przez zdolność wymienionego enzymu do rozszczepiania wiązania między resztami ksylopiranozowymi tylko w sytuacji, gdy co najmniej dwie kolejne reszty ksylopiranozowe w łańcuchu ksylopiranozowym nie są połączone z resztą arabinofuranozy. Z tego też względu sekwencje dwóch niepodstawionych reszt ksylopiranozowych muszą być nieobecne lub rzadkie w przypadku opisywanych oligoarabinoksyłanów. Analogicznie, natywne arabinoksyłany pochodzące z jęczmienia i słodu muszą zawierać fragmenty złożone z co najmniej czterech

niepodstawionych przez arabinofuranozę reszt ksylopiranozowych, ponieważ jako produkty inkubacji występują: ksyloza, ksylobioza i ksylotrioza [54].

Zastosowanie oczyszczonego preparatu enzymatycznego o aktywności endo- β -1,4-ksylanazy (E.C. 3.2.1.8) z hodowli *Aspergillus awamori* w celu degradacji arabinoksylianów jęczmienia i słodu powodowało wytworzenie oligomerów o stopniu polimeryzacji poniżej DP 6, zaś oligomery o DP powyżej 6 występowały w niskich stężeniach [51]. Największy udział miały oligoarabinoksyliany mające od 3 do 6 reszt ksylopiranozowych. Podobnie, jak w przypadku arabinoksylianów z jęczmienia i słodu niepoddanych hydrolizie za pomocą endo- β -1,4-ksylanazy, również po hydrolizie arabinoksylianów występowały niewielkie różnice w budowie uzyskanych oligomerów. Na podstawie analizy miejsca podstawienia reszty ksylopiranozowej przez arabinofuranozę w uzyskanych oligomerach można stwierdzić, że substytucja ksylozy w pozycji O-2 o wiele silniej hamuje degradację arabinoksylianów w porównaniu z substytucją w pozycji O-3. Może to częściowo wyjaśniać ograniczoną degradację arabinoksylianów w czasie słodowania, a nawet w czasie zacierania słodu. W związku z tym, dodatek samej endo- β -1,4-ksylanazy może być niewystarczający do uzyskania odpowiedniej degradacji arabinoksylianów w wysłodzinach.

W hodowlach prowadzonych przy użyciu szczepu *A. niger* CBS 120.49 w obecności wyizolowanego ksylanu owsianego, grzyb wytwarzał esterazę kwasu ferulowego o masie cząsteczkowej wynoszącej $36 \cdot 10^3$ Da [18]. Opisywana esteraza kwasu ferulowego wykazywała aktywność enzymatyczną wobec metylowych pochodnych kwasu cyjanonowego charakteryzujących się obecnością grupy metoksylowej w pozycji C3 pierścienia fenolowego, lecz nie powodowała hydrolizy wiązania estrowego w połączeniach metanolu i pochodnych kwasu benzoowego. Obecność grupy metoksylowej w pozycji C3 pierścienia cząsteczki kwasu fenolowego i nienasyconego łańcucha alifatycznego wydaje się być koniecznym warunkiem działania omawianej esterazy. Enzym wykazywał także aktywność wobec octanu p-nitrofenolu. Optymalna wartość pH działania esterazy wynosiła 5,0 zaś optimum temp. 55–60°C. *Aspergillus niger* produkował esterazę kwasu ferulowego w hodowlach prowadzonych na wysłodkach z buraka cukrowego. Enzym wykazywał aktywność w stosunku do ferulowanych arabinoksylianów o różnej masie molowej i budowie [34].

Esterazy kwasu ferulowego produkowane przez różne szczepy *A. niger* mogą wykazywać zróżnicowaną zdolność odszczepiania wolnego kwasu ferulowego z polisacharydów ścian komórkowych określonych substratów. Np. aktywność esterazy kwasu ferulowego występowała w hodowlach *A. niger* prowadzonych na wytlókach z buraka cukrowego, arabanie z wysłodków buraczanych, otrębach pszennych, lecz aktywności tej nie stwierdzono, gdy źródłem węgla była pektyna z buraka cukrowego pozbawiona reszt kwasu ferulowego w formie estrowej [13].

Esteraza kwasu ferulowego może degradować diferulowe połączenia między polisacharydami ścian komórkowych. Szczegółowe badania nad esterazą kwasu ferulowego produkowaną przez grzyby *A. niger* wykazały, że enzym ten był zdolny do hydrolizy trzech podstawowych wiązań dehydrodiferulowych obecnych w ścianach

komórkowych roślin. Enzym specyficznie działał na wiązania diferulowe występujące w modelowych etylowych estrach dehydrodimerowych zawierających wiązania 5-5, 8-5 i 8-O-4-benzofuranowe. Hydroliza połączeń dehydrodiferulowych przebiegała przy udziale enzymu w dwóch etapach: pierwszy etap to odhydrolizowanie wolnego kwasu ferulowego z formy dimeru, zaś drugi etap to rozpuszczenie monoestrowej pochodnej kwasu ferulowego o ładunku ujemnym. Esteraza nie była zdolna do hydrolizy drugiego wiązania estrowego w monoestrze 8-5-benzofuranowym, dlatego opisywany enzym mógł brać udział w degradacji polisacharydów ściany komórkowej roślin bez uwalniania wolnego kwasu ferulowego [27].

W celu dokładniejszego zbadania esterazy kwasu ferulowego zidentyfikowano fragmenty DNA odpowiedzialne za ekspresję genów kodujących esterazę kwasu ferulowego i arabinofuranazydazę bakterii *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa* [25]. Uzyskane białko enzymatyczne miało masę cząsteczkową wynoszącą $58,5 \cdot 10^3$ Da. W obecności endo-1,4- β -D-ksylanazy enzym uwalniał reszty octanowe z acetyloksylanu i kwas ferulowy z otrąb pszennych pozbawionych skrobi, nie powodował jednak hydrolizy wiązań estrowych przy braku aktywności ksylanolitycznej w preparacie. Arabinofuranazydaza, esteraza kwasu ferulowego i endoksylnaza produkowane przez omawiany szczep bakteryjny miały identyczny niekatalityczny obszar wiązania celulozy, a co za tym idzie, zdolność do adsorpcji na celulozie. Prawdopodobnym substratem działania omawianych enzymów były acetylowane ksylooligosacharydy połączone w pozycjach O-2, O-3 lub w obu pozycjach z resztami arabinofuranozydowymi, które były z kolei połączone wiązaniem estrowym z kwasem ferulowym.

Inny gatunek wskazywany jako producent esterazy kwasu ferulowego to *Penicillium funiculosum* [35]. Wyprodukowana przez jeden ze szczepów ww. gatunku esteraza wykazywała aktywność wobec zestryfikowanych pochodnych kwasu cynamonowego oraz zdolność wiązania się do mikrokryształicznej celulozy, co sugeruje, że substraty działania enzymu były zlokalizowane w ścianie komórkowej.

Bakterie jelitowe, obok wielu enzymów hydrolitycznych, wytwarzają esterazy kwasu ferulowego, zdolne do uwalniania kwasu ferulowego z połączeń estrowych, jednak konieczne jest bliższe scharakteryzowanie właściwości tych enzymów, jak również szczepów drobnoustrojów je wytwarzających [21]. Bakterie z rodzaju *Bacillus* i *Lactobacillus* są wskazywane jako potencjalne źródło esterazy kwasu ferulowego [15]. Spośród 80 szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus* i 50 szczepów bakterii z rodzajów *Enterococcus* i *Lactobacillus* najwyższą zdolność produkcji esterazy kwasu ferulowego, w podłożu z ferulanem etylowym jako głównym źródłem węgla, wykazały bakterie *Bacillus subtilis* oraz *Lactobacillus fermentum* NCFB 1751. Niektóre szczepy z rodzaju *Streptomyces*, np. szczep *Streptomyces avermitilis* CECT 3339 produkował zewnątrzkomórkową esterazę kwasu ferulowego przy wykorzystaniu różnych źródeł lignocelulozowych [26]. Zdolność uwalniania kwasu ferulowego przez enzym była około 100 razy wyższa w obecności preparatu enzymatycznego Celluclast, będącego kompleksowym preparatem o wysokiej aktywności celulazy i wielu pobocznych

aktywnościach enzymatycznych hemicelulaz, lecz niewykazującym aktywności esterazy kwasu ferulowego. Enzym wykazywał optimum pH przy wartości około 6,0 i był termostabilny do temp. 60°C, możliwe jest więc jego wykorzystanie w wielu dziedzinach przemysłu, np. w przemyśle browarniczym lub też w przerobieniu produktów ubocznych, takich jak młóto browarnicze.

Innym źródłem esterazy kwasu ferulowego o potencjalnym zastosowaniu przemysłowym okazał się anaerobowy szczep grzyba *Neocallimastix MC-2* [12]. Szczep ten wykazywał zdolność do produkcji dwóch zewnątrzkomórkowych esteraz kwasu ferulowego, mających masy cząsteczkowe $69 \cdot 10^3$ Da i $24 \cdot 10^3$ Da. Optymalne wartości pH działania obu enzymów zawierały się w zakresie odpowiednio 5,5–6,2 oraz 6,4–7,6, zaś optymalna temp. działania obu enzymów to 40°C. Obok enzymów hydrolizujących wiązanie estrowe kwasu ferulowego, ww. szczep grzyba wytwarzał zewnątrzkomórkową esterazę kwasu p-kumarowego o masie cząsteczkowej $11 \cdot 10^3$ Da. Optymalna wartość pH działania enzymu wynosiła 7,2 zaś optymalna temp. działania 40°C. [11]. Zarówno obie esterazy kwasu ferulowego, jak i esteraza kwasu p-kumarowego wykazywały wysoką aktywność w stosunku do oligomerów arabinoksylozowych zbudowanych z dwóch reszt ksylozowych i reszty arabinofuranozowej zestryfikowanej przez kwas fenolowy. Wysoki poziom aktywności enzymów degradujących arabinoksylany, wytwarzanych przez grzyb z rodzaju *Neocallimastix*, może w znacznym stopniu przyczynić się do biodegradacji odpadów pochodzenia roślinnego. Hydroliza wiązań estrowych z jednej strony uwalnia kwasy fenolowe, które mogą być następnie dalej przemysłowo przetwarzane, z drugiej zaś strony materiał biologiczny jest bardziej podatny na działanie bakterii przez wyższą biodostępność polisacharydów.

Współdziałanie endo-1,4- β -ksylanazy, esterazy kwasu ferulowego i acetyloesterazy w czasie degradacji arabinoksylianów

W wielu pracach badawczych szczegółowo omawiana jest współpraca ksylanaz i esteraz kwasu ferulowego w degradacji materiałów o wysokiej zawartości polisacharydów budulcowych ściany komórkowej roślin wyższych. Esteraza produkowana przez szczep *A. niger* AnFaeA wydajnie uwalniała kwas ferulowy z otrąb pszennych i wysłodzin piwowarskich; w obecności ksylanazy produkowanej przez *Bacillus subtilis* stopień uwolnienia kwasu ferulowego wyniósł ponad 50% całkowitej zawartości tego kwasu w wysłodzinach; scharakteryzowano 11 ksylanaz współdziałających z różnymi esterazami kwasu ferulowego w uwalnianiu kwasu ferulowego, przy czym 10 ksylanaz miało zdolność do uwalniania form dimerowych kwasu ferulowego. Spośród przebadanych esteraz kwasu ferulowego, jedynie wcześniej wymieniony enzym AnFaeA produkowany przez szczep *A. niger* wykazywał zdolność do uwalniania 5-5' dimerów kwasu ferulowego bez współdziałania z ksylanazą [24]. Zastosowanie tej esterazy w czasie uwalniania kwasu ferulowego z wysłodzin może mieć znaczenie w czasie uwalniania kwasu ferulowego w celu jego przemysłowego wykorzystania. Zaobserwowano synergizm pomiędzy

licznymi esterazami kwasu ferulowego produkowanymi przez drobnoustroje *Neurospora crassa*, *A. niger* i *Talaromyces stipitatus* oraz endo-1,4- β -ksylanazą produkowaną przez *A. niger*, *A. oryzae*, *Fibrobacter succinogenes* i *A. aceulatus* [24].

W innych badaniach [5] określono stopień uwalniania kwasu ferulowego z wysłodzin piwowarskich przez esterazę kwasu ferulowego zawartą w ekstrakcie ze słodu. Enzym uwalniał 1,5% całkowitej zawartości kwasu ferulowego, jednak obecność ksylanazy wyprodukowanej przez *Trichoderma reesei* zwiększała stopień uwolnienia kwasu ferulowego do 15%. Najwyższy stopień uwalniania kwasu ferulowego z wysłodzin uzyskano w przypadku, gdy wysłodziny inkubowano początkowo z preparatem ksylanolitycznym, zaś później dodawano ekstrakt słodowy zawierający esterazę kwasu ferulowego. Nie stwierdzono obecności wolnego kwasu ferulowego w czasie inkubacji grzybowej ksylanazy bez dodatku ekstraktu ze słodu. Wskazuje to na występowanie synergizmu pomiędzy dwoma wymienionymi enzymami.

W przypadku, gdy stężenie endo- β -1,4-ksylanazy jest zbyt niskie, następuje zbyt mała modyfikacja polisacharydów nieskrobiowych, co utrudnia i zmniejsza uwalnianie kwasu ferulowego. Synergizm działania esterazy kwasu ferulowego i endo- β -1,4-ksylanazy jest widoczny także w stopniu uwalniania cukrów neutralnych, gdyż stężenie ksylozy i ksylobiozy uwalnianej w czasie jednoczesnego działania obu enzymów było wyższe niż w przypadku, gdy każdy z enzymów działał oddzielnie. Esteraza kwasu ferulowego FAE III produkowana przez *A. niger* była wskazywana jako przyczyna uwalniania β -glukanów ze ściany komórkowej jęczmienia [40]. Opisany proces można wyjaśnić hydrolizą wiązania estrowego kwasu ferulowego z arabinoksylianami, co może przyczyniać się do częściowej dekompozycji uporządkowanej struktury ściany komórkowej i prowadzić następnie do uwalniania β -glukanów do roztworu, gdyż są one fizycznie związane z pentozanami.

Badania prowadzone z wykorzystaniem esterazy kwasu ferulowego FAE-III, wytwarzanej przez grzyby *A. niger*, dowiodły, że enzym uwalniał jedynie około 3,3% kwasu ferulowego zawartego w wysłodzinach. Jednakże w obecności endo-1,4- β -ksylanazy, produkowanej przez grzyb *Trichoderma viride*, stopień uwolnienia kwasu ferulowego z wiązań estrowych w arabinoksylianach sięgał około 30% ogólnej zawartości kwasu ferulowego [7]. Badania nad uwalnianiem kwasu ferulowego z otrąb pszennych w obecności endo-1,4- β -ksylanazy produkowanej przez grzyb *Trichoderma viride* oraz esterazy kwasu ferulowego z *Aspergillus niger* w skali laboratoryjnej wykazały opłacalność tego procesu [22]. Należy podkreślić, że endo-1,4- β -ksylanaza produkowana przez grzyb *Trichoderma viride* nie uwalniała kwasu ferulowego, lecz jedynie niskocząsteczkowe oligoarabinoksyliany połączone wiązaniem estrowym z kwasem ferulowym [20].

Opisana została esteraza kwasu ferulowego produkowana przez *Streptomyces olivochromogenes* [17]. Enzym ten ma masę cząsteczkową $29 \cdot 10^3$ Da, charakteryzuje

się optymalną wartością pH działania wynoszącą około 5,5 oraz optymalną temp. działania wynoszącą 30°C. Enzym wykazuje także aktywność acetyloesterazy. Charakterystyczną właściwością omawianego enzymu jest niezdolność do uwalniania kwasu ferulowego z oczyszczonych otrąb pszennych w przypadku braku aktywności endo-1,4- β -ksylanazy. Ponadto, obecność samej endo-1,4- β -ksylanazy nie jest wystarczająca do uwalniania kwasu ferulowego. Istnieje konieczność obecności obu enzymów w celu degradacji arabinoksylianów, gdyż esteraza kwasu ferulowego produkowana przez szczep *Streptomyces olivochromogenes* wymaga obecności drobnocząsteczkowych oligoarabinoksylianów, powstających dzięki aktywności endo-1,4- β -ksylanazy.

W hodowlach innych grzybów z rodzaju *Aspergillus*, np. *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. terreus* prowadzonych w obecności słomy pszennej, wysłodzin, wyłoków buraczanych lub otrąb pszennych stwierdzono występowanie aktywności zewnątrzkomórkowej esterazy kwasu ferulowego, esterazy acetyloksylanu oraz acetyloesterazy, przy czym aktywność enzymatyczna znacznie wzrastała w obecności endo- β -1,4-ksylanazy pochodzącej z *Trichoderma reesei* [47].

W innych badaniach z wykorzystaniem szczepu *Aspergillus niger* i rekombinowanego szczepu *Pseudomonas fluorescens* wykazano, że esterazy kwasu ferulowego wytwarzane przez oba szczepy współdziałały z endo- β -1,4-ksylanazami wyprodukowanymi przez grzyby *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* lub bakterie *Pseudomonas fluorescens*, w uwalnianiu specyficznego estru, dimeru 5-5'-diFa (kwas (E,E-4-4'-dihydroksy-5,5'-dimetoksy-3,3'bicynamonowy). Dimer ten był tworzony niezależnie od tego, czy oczyszczone frakcje polisacharydów ścian komórkowych wyizolowane z jęczmienia i pszenicy poddane były wcześniejszej degradacji pod wpływem endo- β -1,4-ksylanazy lub też enzymu tego wcześniej nie zastosowano. Stężenie uwolnionych dimerów kwasu ferulowego zależne było od źródła zastosowanej ksylanazy [7].

Esteraza kwasu ferulowego produkowana przez grzyb *Sporotrichum thermophile* wykazywała wysoką aktywność w stosunku do metylowej pochodnej kwasu p-kumarowego. Aktywność esterazy wobec p-kumaranu metylowego była odpowiednio 2,5 i 12 razy wyższa w porównaniu z aktywnością enzymu wobec estru metylowego kwasu kawowego i ferulanu metylowego [49]. Enzym wykazywał aktywność wobec substratów zawierających kwas ferulowy połączony estrowo z węglem C-5 i C-2 arabinofuranozy i hydrolizował także wiązanie estrowe w 4-nitrofenylo-5-O- α -L-arabinofuranozydzie 2 razy efektywniej niż wiązanie estrowe w 4-nitrofenylo-5-O- α -L-arabinofuranozydzie. Kwas ferulowy był uwalniany z 47 razy wyższą wydajnością z otrąb pszennych, jeśli w układzie badawczym obecna była jednocześnie endo-1,4- β -ksylanaza produkowana przez *Sporotrichum thermophile*.

W hodowlach grzyba *Aspergillus awamori* prowadzonych w obecności oczyszczonych frakcji ścian komórkowych ryżu stwierdzono obecność esterazy kwasu ferulowego o masie molowej 112·10³ Da, a także esterazy kwasu p-kumarowego o

masie cząsteczkowej $75 \cdot 10^3$ Da [36]. Zidentyfikowana aktywność esterazy kwasu ferulowego wykazywała uzdolnienia do hydrolizy metylowej pochodnej kwasu ferulowego oraz estrów kwasu ferulowego występujących w oczyszczonych frakcjach rozpuszczalnego w wodzie ksylanu wyodrębnionego ze słomy pszennej. Esteraza kwasu p-kumarowego, obecna w płynie pochodowym w mniejszym stężeniu niż esteraza kwasu ferulowego, wykazywała aktywność względem analogicznych substratów. W przypadku obu esteraz produkowanych przez szczep *Aspergillus awamori* występował silny synergizm działania z oczyszczoną endo- β -1,4-ksylanazą. Oba enzymy charakteryzowały się wyższą aktywnością względem krótkich fragmentów ksyloligosacharydowych zestryfikowanych resztami kwasu ferulowego, które powstawały po degradacji arabinoksylianów przez ksylanazę z *Trichoderma reesei* [29]. Synergizm ten był silnie uzależniony od źródła z jakiego pochodziła endo- β -1,4-ksylanaza, gdyż profil powstających oligoarabinoksylianów był różny [4].

Szczepy grzyba *Aspergillus niger* i *Aspergillus terreus* są wskazywane jako źródło endo-1,4- β -ksylanazy (EC3.2.1.8) [28]. W hodowlach grzybów w podłożu zawierającym różnorodne odpadowe materiały przemysłowe, takie jak: otręby pszenne, słoma ryżowa, otręby sojowe uzyskano wysoką aktywność endo-1,4- β -ksylanazy, przy czym najlepszym induktorem do produkcji ksylanazy były otręby pszenne.

Synergizm działania ksylanazy i esterazy kwasu ferulowego można zaobserwować w przypadku enzymów produkowanych przez grzyba *Trichoderma viride* oraz bakterie *Pseudomonas fluorescens*. Endo-1,4- β -ksylanaza wyprodukowana przez szczep *Trichoderma viride* zwiększała stopień uwalniania kwasu ferulowego z oczyszczonych otręb pszennych w obecności esterazy kwasu ferulowego wytworzonej przez szczep *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa* skuteczniej niż endo-1,4- β -ksylanaza wyprodukowana przez *P. fluorescens*. Uwalnianie kwasu ferulowego z oczyszczonych otręb pszennych było ściśle uzależnione od zastosowanej endo-1,4- β -ksylanazy, przy czym wpływ na aktywność esterazy kwasu ferulowego miała wielkość oligosacharydów powstających w wyniku działania ksylanazy. Esteraza kwasu ferulowego produkowana przez *Pseudomonas fluorescens* wykazywała najwyższą aktywność wobec substratów złożonych z co najmniej czterech reszt cukrowych połączonych z resztą kwasu ferulowego [19].

Silny synergizm działania zaobserwowano także w przypadku acetyloesterazy produkowanej przez *Schizophyllum commune* oraz endo-1,4- β -ksylanazy produkowanej przez *Trichoderma reesei* [10]. Obecność reszt octanowych w acetyloksylanie obniżała aktywność endo-1,4- β -ksylanazy. Jednocześnie w przypadku braku endo-1,4- β -ksylanazy, aktywność acetyloesterazy w stosunku do acetyloksylanu była znacznie ograniczona. Aktywność ksylanazy w stosunku do acetyloksylanu w obecności acetyloesterazy była równa aktywności ksylanolitycznej wobec tego substratu pozbawionego zestryfikowanych reszt octanowych w łańcuchu ksylanowym.

Inne opisane źródło acetyloesterazy to szczep *Candida guilliermondii* NRRL Y-17257 [9]. Synergizm działania między α -L-arabinofuranozydazą, endo-1,4- β -

ksylanazą i β -ksylanazą w czasie degradacji arabinoksylianów stwierdzono w przypadku hodowli grzyba *Aspergillus oryzae* HL15 prowadzonych na podłożu zawierającym ziarno sojowe [30].

Charakterystyka drobnoustrojów uzdolnionych do transformacji kwasu ferulowego do waniliny

Kwas ferulowy od dawna wskazywany jest jako prekursor waniliny, cennego składnika aromatycznego szeroko wykorzystywanego w produkcji żywności. Wanilina (aldehyd 4-hydroksy-3-metoksycynamonowy) pochodzenia naturalnego jest wielokrotnie droższa niż produkowana na drodze syntetycznej z ligniny lub gwajakolu. Wysoka cena waniliny pochodzenia naturalnego jest spowodowana ograniczeniami upraw wanilii. Różnica w cenie naturalnej i syntetycznej waniliny oraz rosnące wymagania konsumentów dotyczące naturalnych składników żywności wymuszają potrzebę poszukiwania nowych źródeł tego dodatku do żywności [45]. Z tego też względu prowadzone są intensywne badania mające na celu opracowanie technologii pozwalających na uzyskiwanie waniliny z naturalnych źródeł na drodze biotechnologicznej. Poszukiwane są szczepy drobnoustrojów wykazujących zdolność do konwersji kwasu ferulowego w podłożu hodowlanym do waniliny. Kwas ferulowy jest obiecującym substratem do produkcji waniliny, gdyż może być obecny w stosunkowo wysokich stężeniach w pożywce hodowlanej, nie działając toksycznie na drobnoustroje przetwarzające go do waniliny.

Drobnoustroje z rodzaju *Pseudomonas* są wskazywane jako uzdolnione do transformacji kwasu ferulowego w wanilinę, np. szczep *P. fluorescens* BF13 okazał się szczepem wysoce uzdolnionym do biotransformacji kwasu ferulowego do kwasu waniliowego. Intensywność procesu transformacji uzależniona była od stężenia biomasy i zawartości kwasu ferulowego w płynie hodowlanym [2]. W warunkach, gdy kwas ferulowy był jedynym źródłem węgla, wydajność biotransformacji do kwasu waniliowego wynosiła 95% w ciągu 5-godzinnej hodowli [3].

Wanilinę wytwarza także grzyb *Pycnoporus cinnabarius*. Drobnoustrój ten hodowany w obecności glukozy i fosfolipidów jako źródła węgla, jest zdolny do wydajnej biotransformacji kwasu ferulowego do waniliny [43].

W hodowlach z użyciem wyizolowanego drobnoustroju *Pseudomonas putida*, zastosowanie wysokiego stężenia kwasu ferulowego w ilości ponad 1 g/l pożywki nie wywoływało zahamowania wzrostu drobnoustrojów. W tych warunkach kwas ferulowy był przetwarzany do waniliny, a następnie do kwasu waniliowego w pożywce glukozowej w ciągu 4,5 godz. [41]. Podobny wynik uzyskuje się w hodowlach grzybów *Streptomyces setoni*, przy czym w tym przypadku wanilina nie jest przetwarzana do kwasu waniliowego, lecz kumulowana po uzyskaniu granicznego stężenia kwasu w pożywce. Przy zastosowaniu pożywki zawierającej 8 g kwasu ferulowego stężenie kwasu waniliowego osiągało poziom 200 mg/l, podczas gdy zawartość waniliny dochodziła do 3,8 g/l. Zahamowanie przetwarzania waniliny do kwasu waniliowego i gromadzenie waniliny w pożywce uzyskiwano w przypadku

zastosowania stężenia kwasu ferulowego od 4 do 10 g/l pożywki. Możliwą drogą maksymalnego gromadzenia waniliny poprzez hamowanie jej przetwarzania do kwasu waniliowego jest inhibicja dehydrogenazy waniliny. Reasumując, można stwierdzić, że niektóre drobnoustroje, np. *S. setonii* dysponują wyjątkowymi zdolnościami metabolicznymi, dzięki czemu można uzyskać wysoką nadprodukcję waniliny z kwasu ferulowego [41]. Wyniki tych badań jednoznacznie wskazują na przydatność kwasu ferulowego do wytwarzania waniliny na drodze biotechnologicznej.

Grzyb *Sporotrichum thermophile* jest zdolny do transformacji kwasu ferulowego do kwasu waniliowego. Proces zachodzi poprzez degradację łańcucha propionowego i tworzenie 4-hydrokso-3-metoksystyrenu, który w następnej kolejności jest przetwarzany do kwasu waniliowego. Ponadto następuje nieoksydatywna dekarboksylacja kwasu waniliowego i powstaje gwajakol. Biokonwersja kwasu ferulowego do waniliowego jest uzależniona od stężenia kwasu ferulowego jako głównego źródła węgla w środowisku [48].

Wolne i immobilizowane hodowle bakterii *Haematococcus pluvialis* wykazują zdolność do biotransformacji kwasu ferulowego, aldehydu koniferylowego i kwasu p-kumarowego do metabolitów wywołujących aromat waniliowy – waniliny, kwasu waniliowego, alkoholu waniliowego, ponadto kwasu protokatechowego, p-hydroksobenzoesowego i aldehydu p-hydroksobenzoesowego. Wyższą biotransformację uzyskuje się w przypadku szczepu immobilizowanego, wskazując na przydatność drobnoustroju do wytwarzania aromatów spożywczych na drodze naturalnych procesów [50].

Kwas ferulowy może podlegać O-demetylacji pod wpływem wewnątrzkomórkowej O-demetylazy produkowanej przez niektóre szczepy bakterii, np. *Clostridium methoxybenzovorans* SR3 i *Enterobacter cloacae* DG6, w wyniku czego powstaje kwas kawowy [37]. Powstający kwas kawowy ma wyższą aktywność przeciwutleniającą od kwasu ferulowego w wielu układach badawczych prowadzonych *in vitro*, ze względu na obecność dwóch grup hydroksylowych. W badaniach *in vivo* wskazuje się na podwyższenie aktywności antyoksydacyjnej plazmy krwi oraz ochronne działanie kwasu kawowego w stosunku do α -tokoferolu oraz frakcji LDL [42]. W badaniach *in vitro* kwas kawowy i dihydrokawowy skutecznie hamują utlenianie kwasów tłuszczowych zawartych w tłuszczu zwierzęcym i utlenianie frakcji LDL wyizolowanych z plazmy krwi. Oba kwasy fenolowe skutecznie wiążą wolne rodniki DPPH^{*} [39]. Opisany proces biokonwersji kwasu ferulowego do kawowego może być interesujący ze względu na pozyskiwanie silnego przeciwutleniacza ze stosunkowo tanich źródeł, takich jak: otręby pszenne, wysłodki buraka cukrowego lub wysłodziny browarnicze. Enzym O-demetylaza nie ma zdolności O-demetylacji kwasu ferulowego połączonego z długimi łańcuchami arabinoksylianów, więc proces konwersji kwasu ferulowego do kwasu kawowego musi być poprzedzony wcześniejszym jednoczesnym działaniem esterazy kwasu ferulowego i endo-1,4- β -ksylanazy [38].

Podsumowanie

Prace badawcze dotyczące pozyskiwania kwasu ferulowego na drodze enzymatycznej obróbki wysłodzin, będących głównym produktem ubocznym przy produkcji piwa, są liczne, zaś temat badawczy jest dobrze opracowany. Wysłodziny są bogatym źródłem kwasu ferulowego, naturalnego przeciwutleniacza, który może być przekształcany do innych produktów mających zastosowanie w produkcji żywności. Preparaty uzyskane po enzymatycznej obróbce wysłodzin, charakteryzujące się wysoką zawartością kwasu ferulowego w formie wolnej, jak i estrowej, mogą natomiast stanowić dodatek do wybranych napojów, podnosząc w sposób naturalny potencjał przeciwutleniający produktu.

Literatura

- [1] Adrjanowicz E., Janczar M., Pietkiewicz J.: Kierunki zagospodarowania odpadów przemysłu piwowarskiego. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 1999, **11**, 13-16.
- [2] Andreoni V., Bernasconi S., Bestetti G.: Biotransformation of ferulic acid and related compounds by mutant strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, **42** (6), 830-835.
- [3] Barghini P., Montebove F., Ruzzi M., Schiesser A.: Optimal conditions for bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by *Pseudomonas fluorescens BF13* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, **49**, 309-314.
- [4] Bartolome B., Faulds C.B., Tuohy M., Hazlewood G., Gilbert H.J., Williamson G.: Influence of different xylanases on the activity of ferulic acid esterase on wheat bran. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1995, **22**, 65-73.
- [5] Bartolome B., Garcia-Conesa M., Williamson G.: Release of bioactive compound, ferulic acid from malt extracts. *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, **24**, 379S.
- [6] Bartolome B., Faulds C.B., Williamson G.: Enzymic release of ferulic acid from barley spent grain. *J. Cereal Sci.*, 1997, **25**, 285-288.
- [7] Bartolome B., Faulds C.B., Kroon P.A., Gilbert H.J., Hazlewood G., Williamson G.: An *Aspergillus niger* esterase (ferulic acid esterase III) and a recombinant *Pseudomonas fluorescens* subsp. cellulosa esterase (XylD) release a 5,5' ferulic dehydromer (diferulic acid) from barley and wheat cell walls. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63** (1), 208-212.
- [8] Bartolome B., Gomes-Cordoves C.: Barley spent grain: release of hydroxycinnamic acids (ferulic and p-coumaric acids) by commercial enzyme preparations. *J. Sci. Food Agric.*, 1999, **79**, 435-439.
- [9] Basaran P., Hang D.: Purification and characterization of acetyl esterase from *Candida guilliermondii*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2000, **30** (2), 167.
- [10] Biely, P., Vrsanska M., Kratky, Z.: Xylan degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus*. *Eur. J. Biochem.*, 1980, **108**, 313-321.
- [11] Borneman W.S., Ljungdahl L.G., Hartley R.D., Akin D.E.: Purification and characterization of p-coumaroyl esterase from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **57** (8), 2337-2344.
- [12] Borneman W.S., Ljungdahl L.G., Hartley R.D., Akin D.E.: Purification and partial characterization of two feruloyl esterases from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58** (11), 3762-3766.
- [13] Brezillon C., Kroon P.A., Faulds C.B., Brett G.M., Williamson G.: Novel ferulic acid esterases are induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar-beet pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1996, **45**, 371-376.

- [14] Diaz Plaza E., Bartolome B., Gomez Cordoves C.: Phenolic antioxidants from barley spent grain. 2nd Intern. Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-2), <http://www.mdpi.org/ecsoc/>, 1998, September 1-30.
- [15] Donaghy J., Kelly P.F., McKay A.M.: Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus ssp.* and *Lactobacilli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, **50**, 257-260.
- [16] Ezeonu F.C. Okaka A.N.C.: Process kinetics and digestion efficiency of anaerobic batch fermentation of brewer's spent grains (BSG). *Process Biochem.*, 1996, **31** (1), 7-12.
- [17] Faulds C.B., Williamson G.: The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes*. *J. Gen. Microbiol.*, 1991, **137**, 2339-2345.
- [18] Faulds C.B., Williamson G.: Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose. *Microbiol.*, 1994, **140**, 779-787.
- [19] Faulds C.B. Ralet M.C., Williamson G., Hazlewood G.P., Gilbert H.J.: Specificity of an esterase (XYLD) from *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1995, **1243**, 265-269.
- [20] Faulds C.B., Williamson G.: Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE III) from *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, **43**, 1082-1087.
- [21] Faulds C.B., Williamson G.: Release of the antioxidant, ferulic acid, from plant material by specific esterases. *Biochem. Soc. Trans.*, 1995, **23**, 253S.
- [22] Faulds C.B., Bartolome B., Williamson G.: Novel biotransformations of agro-industrial cereal waste by ferulic acid esterases. *Indust. Crops Prod.*, 1997, **6**, 367-374.
- [23] Faulds C.B., Sancho A.I., Bartolome B.: Mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain by fungal feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **60**, 489-493.
- [24] Faulds C.B., Zanichelli D., Crepin V.F., Connerton I.F., Juge N., Bhat M.K., Waldron K.W.: Specificity of feruloyl esterases for water-extractable and water-unextractable feruloylated polysaccharides: influence of xylanase. *J. Cereal Sci.*, 2003, **38**, 281-288.
- [25] Ferreira M.A., Wood T.M. Williamson G., Faulds C., Hazlewood G.P., Black G.W.: A modular esterase from *Pseudomonas fluoorescens subsp. cellulosa* contains a non-catalytic cellulose binding domain. *Biochem. J.*, 1993, **294**, 349-355.
- [26] Garcia B.L., Ball A.S., Rodriguez J., Perez- Leblic M.I., Arias M.E., Copa-Patino J.L.: Production and characterization of ferulic acid esterase activity in crude extracts by *Streptomyces avermitillis* CECT 3339. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, **50**, 213-218.
- [27] Garcia-Conesa M.T., Kroon P.A., Ralph J., Mellon F.A., Colquhoun I.J., Thibault J.F., Williamson G., A.: cinnamoyl esterase from *Aspergillus niger* can break plant cell wall cross-links without release of free diferulic acids. *Eur. J. Biochem.*, 1999, **266** (2), 644.
- [28] Gawande P.BV., Kamat M.Y.: Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. *J. Appl. Microbiol.*, 1999, **87** (4), 511.
- [29] Haapala R., Parkkinen E., Suominen P., Linko S.: Production of endo-1,4- β -glucanase and xylanase with nylon-web immobilized and free *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb. Technol.*, 1996, **18**, 495-501.
- [30] Hashimoto T., Nakata Y.: Synergistic degradation of arabinoksyfan with α -L-Arabinofuranosidase, xylanase and β -ksylanosidase from soy sauce koji mold, *Aspergillus oryzae*, in high salt condition. *J. Biosci. Bioeng.*, 2003, **95** (2), 164-169.
- [31] Kishi S., Kimura T., Minami T., Kobayashi H.: Process for producing protein-rich product, fibrous product and/or vegetable oil from brewer's spent grain. United States Patent. Patent Number 5135765, Aug. 4, 1992.
- [32] Kishi S., Kimura T., Minami T., Kobayashi H.: Protein-rich products of brewer's spent grain origin. United States Patent Number 5156877, Oct. 20, 1992.

- [33] Kishi S., Shiba Y., Miyake H., Kuenzel W.: Method of wet peeling for brewer's spent grain. United States Patent 5702748, Dec.30, 1997.
- [34] Kroon P.A., Williamson G. P.: Release of ferulic acid from sugar-beet pulp by using arabinanase, arabinofuranosidase and an esterase from *Aspergillus niger*. Biotechnol. Appl. Biochem. 1996, **23**, 263-267.
- [35] Kroon P.A., Williamson G., Fish N.M., Archer D.B., Belshaw N.J.: A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. Eur. J. Biochem., 2000, **267** (23), 6740.
- [36] McCrae S.I., Leith K.M., Gordon A.H., Wood T.M.: Xylan-degrading enzyme system produced by the fungus *Aspergillus awamori*: isolation and characterisation of a feruloyl esterase and a p-cumaroyl esterase. Enzyme Microb. Technol., 1994, **16**, 826-834.
- [37] Micard V., Landazuri T., Surget A., Moukha S., Labat M., Rouau X.: Demethylation of ferulic acid and Feruloyl-Arabinoxylan by Microbial Cell Extracts. Lebensm.-Wiss. u Technol., 2002, **35**, 272-276.
- [38] Micard V., Renard C.M.G.C., Thibault J.-F.: Enzymatic saccharification of sugar-beet pulp. Enzyme Microb. Technol., 1996, **19**, 162-170.
- [39] Moon J.H., Terao J.: Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. J. Agric. Food Chem., 1998, **46**, 5062-5065.
- [40] Moore J., Bamforth C.W. Kroon P.A., Bartolome B., Williamson G.: Ferulic acid esterase catalyses the solubilisation of β -glucans and pentosans from the starchy endosperm cell walls of barley. Biotechnol. Lett., 1996, **18** (12), 1423-1426.
- [41] Muheim A., Lerch K.: Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, **51**, 456-461.
- [42] Nardini M., Natella F., Gentili V., DiFelice M., Scaccini C.: Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat: An *in vivo* study. Arch. Biochem. Biophys., 1997, **342** (1), 157-160.
- [43] Oddou J., Stentelaire C., Lesage-Meessen L., Asther M., Ceccaldi B.C.: Improvement of ferulic acid bioconversion into vanillin by use of high-density cultures of *Pycnoporus cinnabarius*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, **53** (1), 1-6.
- [44] Penrose J.D.F. Spent grain-based animal feed material and method for its production. UK Patent Application GB 2220 124 A.
- [45] Priefert H., Rabenhorst J., Steinbuchel A.: Biotechnological production of vanillin. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, **56**, 296-314.
- [46] Smith M.M., Hartley R.D.: Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in Gramineous plants. Carbohydr. Res., 1983, **118**, 65-80.
- [47] Tenkanen M., Schuseil J., Puls J., Poutanen K.: Production, purification and characterization of an esterase liberating phenolic acids from lignocellulosics. J. Biotechnol., 1991, **18**, 69-84.
- [48] Topakas E., Kalogeris E., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P.: Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile* Lebensm. -Wiss. u.-Technol., 2003, **36**, 561-565.
- [49] Topakas E., Stamatis H., Biely P., Christakopoulos P.: Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StAE-A) from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. Appl. Microb. Biotechnol., Published Online: Springer-Verlag 10.1007/s00253-003-1481-6, 2003.
- [50] Tripathi U., Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A.: Biotransformation of phenylpropanoid compounds to vanilla flavor metabolites in cultures of *Haematococcus pluvialis*. Process Biochem., 2002, **38**, 419-426.
- [51] Viřtor R.J., Angelino S.A.G.F., Voragen A.G.J.: Arabinoxylans barley, malt and wort". Proc. Eur. Brew. Conv. Cong., 1991, **23**, 139-146.
- [52] Viřtor R.J., Angelino S.A.G.F., Voragen A.G.J.: Structural features of arabinoxylans from barley and malt cell wall material. J.Cereal Sci., 1992, **15**, 213-222.

- [53] Viëtor R.J., Voragen A.G.J.: Composition of non-starch polysaccharides in wort and spent grain from brewing trials with malt from a good malting quality barley and a feed barley. *J. Inst. Brew.*, 1993, **99**, 243-248.
- [54] Viëtor R.J., Kormelink F.J.M., Angelino S.A.G.F., Voragen A.G.J.: Substitution patterns of water-unextractable arabinoxylans from barley and malt". *Carbohydr. Polym.*, 1994, **24**, 113-118.
- [55] Wackerbauer, K., Kramer P., Siepert J.: Phenolische Aromastoffe in Bier. *Brauwelt*. 1982, **15**, 618-620.

CHARACTERIZATION OF ARABINOXYLAN- DEGRADING MICROBIAL ENZYMES AND THEIR ROLE IN RELEASE OF FERULIC ACID FROM BARLEY SPENT GRAIN

S u m m a r y

The aim of this review was to characterise of bacterial and fungal enzymes taking part in the degradation of arabinoxylans. This study especially describes ferulic acid esterase, xylanase and acetyl esterase. This paper presents the sum of results concerning the possibility of ferulic acid production from barley spent grain using purified enzymes or commercial enzyme preparations of microbial origin. Barley spent grain is the most valuable by-product of brewing industry, rich in precious dietary components like proteins, dietary fiber, fatty acids and others. Ferulic acid is a natural, strong antioxidant commonly present in *Graminaceae* family plants and in a number of by-products of brewing industry – barley spent grain. Ferulic acid can be also microbiologically transformed into other compounds used in food industry, like antioxidant caffeic acid or vanillin, precious flavoring agent.

Key words: ferulic acid, ferulic acid esterase, xylanase, acetyl esterase, barley spent grain, beer ☒