

Magdalena Kurek¹, Izabela Gren^{2*}

¹Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Politechnika Śląska

²Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wpłynęło w listopadzie 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Mikrobiologiczny rozkład kwasu wanilinowego. 2.1. Demetylacja kwasu wanilinowego. 2.2. Dekarboksylacja kwasu wanilinowego. 2.3. Redukcja kwasu wanilinowego. 3. Synteza kwasu wanilinowego. 3.1. Synteza kwasu wanilinowego z kwasu ferulowego. 3.2. Synteza kwasu wanilinowego z eugenolu i izoeugenolu. 4. Podsumowanie

Microbial transformation of vanillic acid

Abstract: Increasing demand for natural vanillic aroma in food industry as well as law restrictions for the usage of chemically synthesized compounds in natural fragrances caused large interest in vanillic production via biotechnological processes. Because vanillic acid is the main substrate for vanillic production, the knowledge of biological processes of its synthesis and the release from lignin is crucial for developing the optimal biotechnological processes. Some microorganisms are able to synthesize vanillic acid from naturally occurring compounds, such as ferulic acid, eugenol and isoeugenol using biotransformation reactions. Large amount of vanillin are produced by reduction of vanillic acid by carboxylic acid reductase (Car). Another pathways of vanillic acid transformation are based on its demethylation and decarboxylation reactions. O-demethylases are NAD(P)H or tetrahydrofolate dependent enzymes. This review presents short characterization of vanillic acid transformation processes by microorganisms.

1. Introduction. 2. Microbial degradation of vanillic acid. 2.1. Demethylation of vanillic acid. 2.2. Decarboxylation of vanillic acid. 2.3. Reduction of vanillic acid. 3. Synthesis of vanillic acid. 3.1. Synthesis of vanillic acid from ferulic acid. 3.2. Synthesis of vanillic acid from eugenol and isoeugenol. 4. Summary

Słowa kluczowe: kwas ferulowy, kwas wanilinowy, lignina, transformacja, wanilina

Key words: ferulic acid, lignin, transformation, vanillic acid, vanillin

1. Wprowadzenie

Nieustający wzrost zanieczyszczenia środowiska oraz poprawa świadomości ekologicznej społeczeństwa sprawiają, że prowadzone są liczne badania dotyczące zarówno biologicznego rozkładu ksenobiotyków, jak i biosyntezy, jako bezpiecznej i naturalnej metody produkcji związków, wykorzystywanych w różnych gałęziach przemysłu. Kwas wanilinowy jest surowcem odnawialnym i obok kwasu ferulowego stanowi główny produkt niecałkowitego, mikrobiologicznego rozkładu ligniny. Jednocześnie jest metabolitem pośrednim katabolizmu i anabolizmu waniliny, powszechnie stosowanego dodatku do żywności. Praca jest przeglądem piśmiennictwa, dotyczącego udziału mikroorganizmów w różnych przemianach kwasu wanilinowego.

Kwas wanilinowy, czyli kwas 4-hydroksy-3-metoksybenzoesowy, należy do grupy związków aromatycznych, spotykanych naturalnie u roślin. Występuje w dużych ilościach w nasionach pnączy wanilii *Vanilla planifolia*, jak również w wielu innych warzywach i owocach, takich jak: winogrona, pomidory, czarne porzeczki, borówki, ziarna pszenicy i soi [11, 20]. Obecność kwasu wanilinowego stwierdzono również w liściach wielu

roślin m.in. *Adenostoma* i *Arctostaphylos*, charakterystycznych dla makii kalifornijskiej, u których pełni on funkcję inhibitora kiełkowania nasion traw i innych roślin zielonych. Obecność kwasu wanilinowego wykazano również w glebie w miejscu występowania tych roślin, co świadczy o niskim stopniu transformacji tego związku przez mikroorganizmy glebowe [14].

Kwas wanilinowy wykazuje właściwości przeciwutleniające i antymutagenne. Aktywność antyoksydacyjna kwasu wanilinowego wynika z obecności pierścienia fenolowego, podstawionego w pozycji *para* i jest dodatkowo wzmocniona obecnością grupy metoksy w pozycji *orto* w stosunku do podstawnika hydroksylowego. Wykazano, że na aktywność przeciwutleniającą kwasu wanilinowego, podobnie jak innych pochodnych kwasu benzoowego i cynamonowego, wpływa estryfikacja, a właściwości redukcyjne są wyższe dla formy wolnej niż metylowanego estru [33, 34]. Ze względu na obecność grupy metoksy (alkoksylowej) w pozycji *meta* pierścienia aromatycznego kwas wanilinowy jest silniejszy niż kwas benzoowy, co można tłumaczyć efektem indukcyjnym, powodującym wyciąganie elektronów ze względu na elektrojemność atomu tlenu, bezpośrednio połączonego z pierścieniem aromatycznym (Rys. 1) [21].

* Autor korespondencyjny: Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; e-mail: izabela.gren@us.edu.pl

2. Mikrobiologiczny rozkład kwasu wanilinowego

Lignina jest aromatyczną substancją wielkocząsteczkową, zapewniającą wytrzymałość roślinnych ścian komórkowych i stanowi istotną część trudno biodegradowalnych odpadów przemysłu papierniczego, spożywczego czy obróbki drewna. Prowadzone są liczne badania nad poznaniem poszczególnych etapów biotransformacji ligniny oraz powstających w wyniku niecałkowitego rozkładu tego związku metabolitów pośrednich, takich jak kwas ferulowy i wanilinowy, a także możliwościami ich wykorzystywania w procesach biosyntezy. Tlenowa biodegradacja ligniny jest procesem wieloetapowym, w którym uczestniczą liczne gatunki grzybów, przeprowadzających depolimeryzację oraz bakterii, katalizujących rozkład poszczególnych składników aromatycznych [19, 25, 30]. Aby kontrolować biodegradację ligniny oraz zwiększyć wydajność poszczególnych etapów procesu, konieczne jest dokładne poznanie właściwości biochemicznych przeprowadzających je mikroorganizmów oraz izolacja i charakterystyka enzymów, katalizujących kluczowe reakcje.

Rozkład kwasu wanilinowego, jednego z istotnych związków aromatycznych uwalnianych w wyniku częściowej biotransformacji ligniny, może przebiegać kilkoma różnymi szlakami (rys. 1). Najbardziej rozpowszechnione u bakterii to demetylacja do kwasu protokatechowego, katalizowana przez demetylazę kwasu wanilinowego oraz nieoksydacyjna dekarboksylacja do gwajakolu, którą przeprowadza dekarboksylaza kwasu wanilinowego. Związki te są następnie metabolizowane poprzez rozszczepienie pierścienia aromatycznego [25, 30]. Inną przemianą, o dużym znaczeniu przemysłowym, jest redukcja kwasu wanilinowego do waniliny [38].

2.1. Demetylacja kwasu wanilinowego

U bakterii zidentyfikowano dwa różne szlaki, którymi może przebiegać demetylacja kwasu wanilinowego do kwasu protokatechowego (rys. 1.A(1) i A(2)). U *Pseudomonas* sp. i *Acinetobacter* sp. metabolizm kwasu wanilinowego rozpoczyna *O*-demetylaza, zależna od NAD(P)H, należąca do oksygenaz. U innych bakterii, m.in. *Sphingomonas paucimobilis*, kwas wanilinowy również ulega *O*-demetylacji do kwasu (3,4-dihydroksybenzoesowego) 3,4-DHB, ale jest to reakcja nieoksydacyjna, w której kofaktorem jest tetrahydrofolian (H_4 folian) [1, 30].

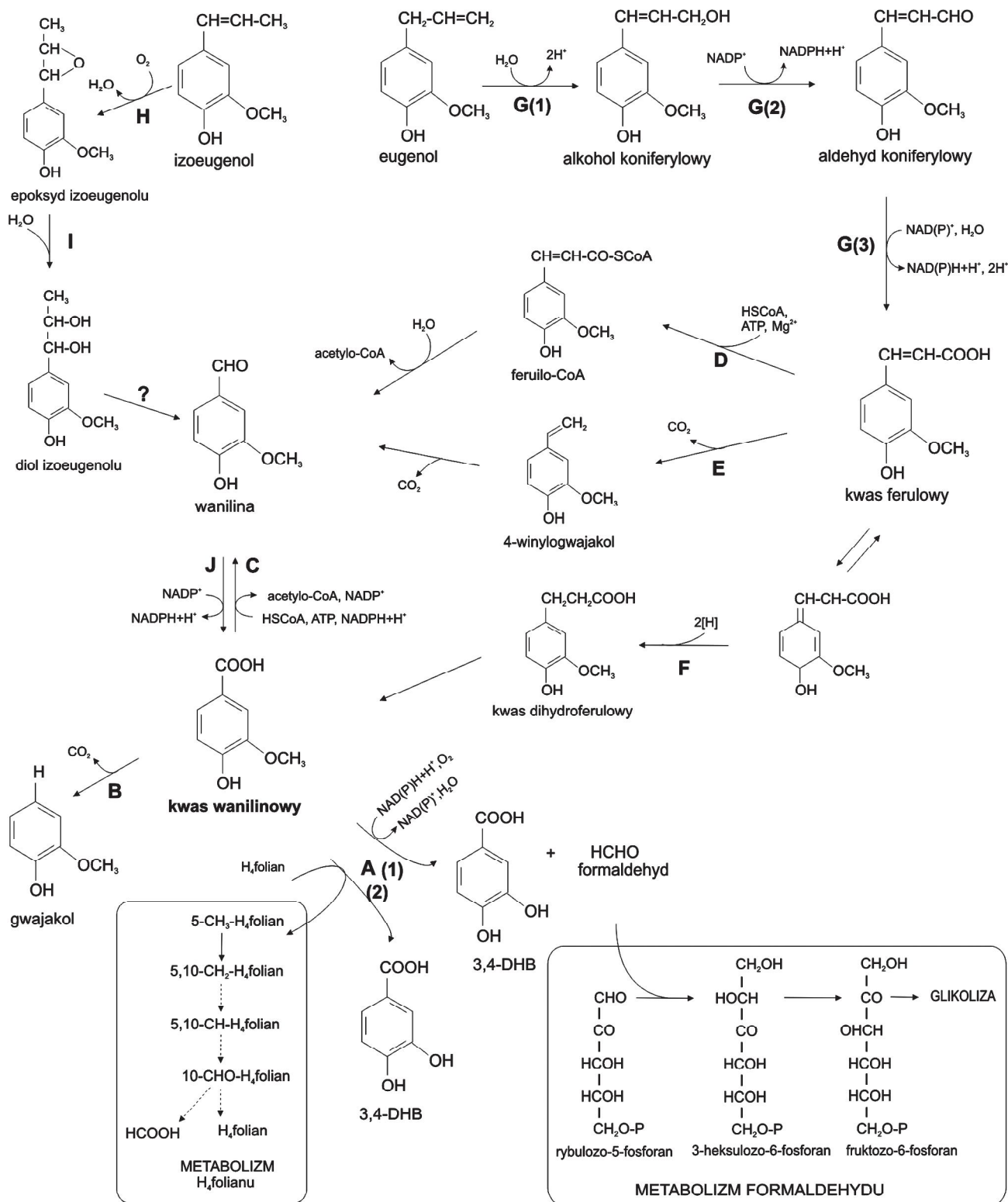
Pierwszym etapem biokonwersji kwasu wanilinowego do 3,4-DHB, katalizowanej przez *O*-demetylazę kwasu wanilinowego, zależną od NAD(P)H, jest hydroksylacja. W reakcji tej oksygenaza przyłącza jeden atom tlenu do węgla grupy metylowej, prowadząc do powstania niestabilnego hemiacetalu, a drugi atom tlenu jest

włączany do cząsteczki wody. Hemiacetal ulega następnie przekształceniu do 3,4-DHB i formaldehydu [28] (rys. 1A(1)).

O-demetylazy kwasu wanilinowego u *Pseudomonas* sp. i *Acinetobacter* sp., charakteryzują się znaczną homologią sekwencji, i są zbudowane z dwóch podjednostek: oksygenazy (VanA) oraz reduktazy (VanB). Ze względu na dwuczłonową budowę oraz obecność centrów żelazo-siarkowych typu [2Fe-2S], jak i mononukleotydu flawinowego (FMN) należą do klasy IA oksygenaz. W części oksydacyjnej występują natomiast centra żelazo-siarkowe [2Fe-2S] oraz niehemowe żelazo. Elektrony niezbędne w procesie hydroksylacji, przepływają ze zredukowanego nukleotydu (NADH), przez FMN i centrum żelazo siarkowe [2Fe-2S] reduktazy do Fe^{2+} , znajdującego się w oksygenazie. Następuje tu przyłączenie tlenu i hydroksylacja [23, 28]. M o r a w s k i i wsp. [23] wykazali, że demetylaza kwasu wanilinowego, występująca u *Acinetobacter* sp., katalizuje wyłącznie demetylację lub monohydroksylację związków posiadających podstawnik metoksy lub metylowy w pozycji *meta* w stosunku do grupy karboksylowej, gdyż obecność grupy karboksylowej oraz podstawnika w pozycji *meta* jest niezbędna, aby przeprowadzić atak nukleofilowy [23].

U *Comamonas testosteroni* BR6020, metabolizującego kwas wanilinowy, izowanilinowy oraz weratrowy, występują oksygenazy: VanA oraz IvaA. Za demetylację kwasu wanilinowego do 3,4-DHB odpowiada, podobnie jak u *Pseudomonas* sp. i *Acinetobacter* sp., oksygenaza VanA. Transport elektronów z NAD(P)H u tego szczepu, katalizuje oksydoreduktaza IvaB. Enzym ten wykazuje dużą homologię z oksydoreduktazą VanB, występującą u innych bakterii demetylujących kwas wanilinowy [30].

W reakcji demetylacji kwasu wanilinowego powstaje oprócz kwasu protokatechowego również formaldehyd. M i t s u i i wsp. [22], w badaniach prowadzonych nad *Burkholderia cepacia* TM1 wykazali, że enzymy wiążące formaldehyd odgrywają istotną rolę w usuwaniu zanieczyszczeń, w tym transformacji kwasu wanilinowego. Biorąc pod uwagę szlak biokonwersji kwasu wanilinowego do 3,4-DHB, obecny u *Pseudomonas* sp., stwierdzili, że formaldehyd pochodzący z substratu wzrostowego indukuje enzymy: syntazę 3-heksulozo-6-fosforanową (HPS) oraz 6-fosfo-3-heksulozoizomerazę (PHI), zaangażowane w szlak rybulozo-mono-fosforanowy (RuMP), odpowiedzialny za wiązanie i detoksykację formaldehydu. Zaobserwowali również, że reakcja transformacji formaldehydu jest etapem limitującym szybkość demetylacji kwasu wanilinowego w szlaku zależnym od NAD(P)H, szczególnie przy jego wysokim stężeniu. Fruktozo-6-fosforan, powstały w szlaku RuMP, jest włączany do glikolizy, napędzając metabolizm bakterii [22]. Metabolizm formaldehydu, powiązany z demetylacją kwasu wanilinowego, przedstawiono na rysunku 1A(1).



Rys. 1. Ogólny schemat biosyntezy i transformacji kwasu wanilinowego.

Enzymy katalizujące poszczególne reakcje: A O-demetylaza kwasu wanilinowego (1) zależna od NAD(P)H, (2) zależna od tetrahydrofolianu; B dekarboksylaza kwasu wanilinowego; C reduktaza kwasu wanilinowego; D ligaza kwas ferulowy-CoA; E dekarboksylaza kwasu ferulowego; F reduktaza; G(1) oksydaza eugenolowa/oksydaza alkoholu wanilinowego, G(2) dehydrogenaza alkoholu koniferylowego, G(3) dehydrogenaza aldehydu koniferylowego; H monooksygenaza izoeugenolu; I hydrolaza; J dehydrogenaza wanilinowa.

Drugim systemem enzymatycznym, transformującym kwas wanilinowy do 3,4-DHB, jest aromatyczna O-demetylaza, zależna od tetrahydrofolianu (H₄folian)

(rys. 1A(2)). Obecność tego enzymu stwierdzono u bakterii anaerobowych, m.in. *Acetobacterium dehalogenans* oraz *Shingomonas paucimobilis* SYK-6. W tym szlaku

transferaza metylowa I katalizuje transfer grupy metylowej kwasu wanilinowego do białka korynoidowego, a transferaza metylowa II przeprowadza dalszą reakcję przeniesienia grupy metylowej na H_4 folian [1, 19]. Aby uzyskać pewność, że demetylaza kwasu wanilinowego u *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 jest zależna od H_4 folianu, przeprowadzono doświadczenie, w którym bakterie hodowano w pożywce nie zawierającej tego kofaktora. W takich warunkach hodowli nie następowała demetylacja kwasu wanilinowego do 3,4-DHB [1, 19].

A b e i wsp. [1] zidentyfikowali gen kodujący O-demetylazę kwasu wanilinowego, zależną od H_4 folianu, w otwartej ramce odczytu *ligM*. Zidentyfikowali również inne geny, kodujące enzymy zaangażowane w demetylację kwasu wanilinowego, a katalizujące metabolizm tetrahydrofolianu: reduktazę 5,10-metyleno- H_4 folianową (*metF*) oraz syntetazę 10-formylo- H_4 folianową (*ligH*). Geny *metF* i *ligH* są położone poniżej *ligM* i wszystkie razem są transkrybowane wspólnie jako jeden operon [1]. Metabolizm tetrahydrofolianu przedstawiono na rysunku 1A(2).

2.2. Dekarboksylacja kwasu wanilinowego

Drugą, obok demetylacji, ważną przemianą kwasu wanilinowego jest jego nieoksydacyjna dekarboksylacja do gwajakolu, katalizowana przez dekarboksylazę kwasu wanilinowego (rys. 1B). Reakcja ta, opisana m.in. u szczepów *Nocardia* sp. NRRL 5646 oraz *Escherichia coli* C2, nie wymaga obecności żadnych kofaktorów i może przebiegać zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych [6, 7, 9]. Proces dekarboksylacji, przebiegający w warunkach tlenowych, u *E. coli* C2 jest jednak bardziej wydajny niż przeprowadzany w warunkach beztlenowych. C h a m k h a i wsp. [6] wykazali, że w obecności tlenu połowa kwasu wanilinowego, znajdującego się w pożywce, ulegała dekarboksylacji w ciągu 9 godzin, natomiast w warunkach anaerobowych proces ten trwał 35 godzin.

Nieoksydacyjna dekarboksylacja kwasu wanilinowego polega na odłączeniu grupy karboksylowej od struktury pierścienia aromatycznego, bez udziału cząsteczki tlenu. D h a r i wsp. [9], w badaniach przeprowadzonych z udziałem *Nocardia* sp. NRRL 5646, wykazali, że reakcja dekarboksylacji kwasu wanilinowego do gwajakolu przebiega z wytworzeniem chinoidynowego metabolitu pośredniego [9]. Enzym katalizujący tę przemianę wykazuje wąską specyficzność substratową, a transformacji podlegają wyłącznie kwasy benzoesowe, podstawione grupą hydroksylową w pozycji *para* w stosunku do grupy karboksylowej. Dodatkowo wymagany jest brak podstawnika w pozycji *meta* lub obecność grupy metoksy [6, 9].

Obecność gwajakolu stwierdzono w wielu winach. Wyizolowano więc mikroorganizmy znajdujące się

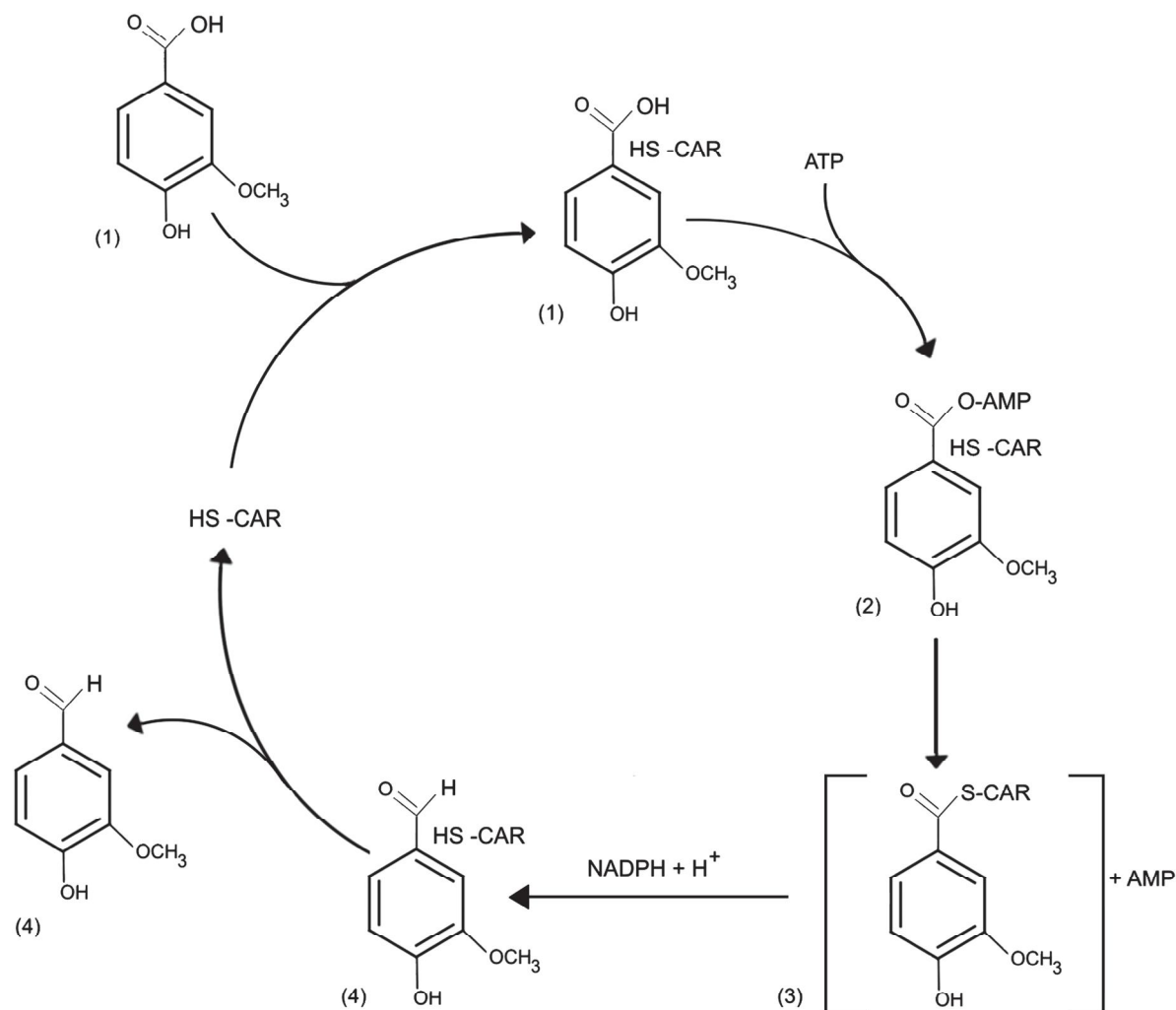
w korku, którym były zamykane. Wykazano, że występuje tam wiele gatunków drożdży, grzybów nitkowatych i pleśniowych oraz bakterii. Przeprowadzono testy na wszystkich mikroorganizmach i zaobserwowano, że cztery szczepy: *Streptomyces* sp. A3, *Streptomyces* sp. A5, *Streptomyces* sp. A13 i *Bacillus subtilis*, były zdolne do dekarboksylacji kwasu wanilinowego. Największą wydajność biotransformacji wykazywał szczep *B. subtilis*, który po 33 h transformował około 55,4% kwasu wanilinowego do gwajakolu, który nie podlegał dalszym przemianom. Dla szczepów z rodzaju *Streptomyces*, A3, A5 i A13, maksymalny poziom dekarboksylacji wynosił, odpowiednio, 34,4%, 40,4% i 53,3%, a ilość zakumulowanego gwajakolu wynosiła 14,3%, 20% i 27,3%. Świadczy to o zdolności tych szczepów do dalszej transformacji gwajakolu w szlaku β -ketoacylowym [2].

Dekarboksylacja kwasu wanilinowego do gwajakolu jest również charakterystyczna dla grzybów *Rhodotorula rubra* oraz *Sporotrichum termophile* w procesie biotransformacji kwasu ferulowego. U *R. rubra* kwas wanilinowy ulega też jednoczesnej demetylacji do kwasu protokatechowego [2, 15, 35]. Zdolność do przeprowadzania zarówno demetylacji, jak i dekarboksylacji kwasu wanilinowego, wykazuje także *Streptomyces* sp. NL15-2K, jednak u tego mikroorganizmu w danym momencie może funkcjonować tylko jeden szlak przemian. Główną drogą transformacji kwasu wanilinowego u NL15-2K jest demetylacja, a szlak dekarboksylacyjny jest w tym momencie wyłączany. Aktywacja tego szlaku zachodzi wyłącznie w obecności kwasu protokatechowego lub weratrowego i funkcjonuje jako zabezpieczenie przed wysokim wewnątrzkomórkowym poziomem 3,4-DHB [27].

Kwas protokatechowy oraz gwajakol, otrzymane w wyniku wstępnej transformacji kwasu wanilinowego, są następnie przekształcane do związków, które mogą zostać wykorzystane przez mikroorganizmy w metabolizmie podstawowym. W warunkach tlenowych pierścień aromatyczny kwasu protokatechowego jest rozszczepiany przy udziale 3,4-dioksygenazy, 2,3-dioksygenazy lub 4,5-dioksygenazy kwasu protokatechowego [16]. Transformacja gwajakolu przebiega natomiast z wytworzeniem katecholu jako podstawowego metabolitu pośredniego, którego pierścień aromatyczny jest rozszczepiany w szlaku *orto* lub *meta* przez dioksygenazykatecholowe [5].

2.3. Redukcja kwasu wanilinowego

Mikrobiologiczna redukcja kwasów karboksylowych jest procesem występującym powszechnie u licznych gatunków bakterii i grzybów. Zdolność do produkcji waniliny z kwasu wanilinowego oraz kwasu ferulowego (rys. 1C, D, E), zaobserwowano m.in. u *Pycnoporus*



Rys. 2. Schemat redukcji kwasu wanilinowego (1) do waniliny (4), katalizowanej przez reduktazę kwasów karboksylowych (HS-CAR). (2) Wanilino-AMP, (3) Kowalencyjny metabolit pośredni.

cinnabarinus i szczepów z rodzaju *Nocardia*. Redukcję kwasu wanilinowego, podobnie jak innych kwasów karboksylowych, katalizuje reduktaza kwasów karboksylowych (Car) [4, 18, 38].

Reduktaza kwasów karboksylowych zawiera miejsce wiązania kwasu karboksylowego i ATP na N-końcowym fragmencie łańcucha polipeptydowego oraz miejsce wiązania NADPH + H⁺ i konserwatywną sekwencję, kodującą miejsce wiązania grupy fosfopantoteinowej koenzymu A w C-końcowej części enzymu. Podstawnik fosfopantoteinowy jest przenoszony z CoA, przez transferazę fosfopantoteinową, na resztę serynową, występującą wewnątrz sekwencji wiążącej. Reduktaza kwasów karboksylowych staje się w pełni funkcjonalnym holoenzymem, kiedy część białkowa enzymu przejdzie proces fosfopantoteinylicacji [38].

Podstawowy mechanizm enzymatycznej redukcji kwasów karboksylowych jest dwuetapowy. Cykl enzymatyczny rozpoczyna się od aktywacji grupy karbonylowej przy udziale ATP, do wysoce reaktywnego karbonylo-AMP. Reszta sulfhydrylowa fosfopantoteinowej

grupy prostetycznej reaguje z karbonylo-AMP, eliminując AMPi prowadząc do powstania tioestru, przez który pochodna kwasu karboksylowego jest kowalencyjnie przyłączana do Car. Tioester ulega następnie redukcji w C-końcowym fragmencie enzymu, przez NADPH + H⁺, uwalniając odpowiedni aldehyd i wolną grupę sulfhydrylo-fosfopantoteinową Car, gotową do przeprowadzenia kolejnego cyklu. Schemat redukcji kwasu wanilinowego do waniliny przedstawiono na rysunku 2 [18, 38, 39].

Ze względu na przemysłowe znaczenie redukcji kwasu wanilinowego do waniliny prowadzone są liczne badania nad określeniem optymalnych warunków przebiegu procesu oraz możliwości stymulacji reakcji. Li i wsp. [18] opisali biotransformację kwasu wanilinowego prowadzoną przez szczep *Nocardia* sp. NRRL 5646. Wykazali, że rosnące bakterie przekształcały prawie cały kwas wanilinowy, dodany do pożywki w stężeniu 800 µg/ml, przed upływem 48 godzin do gwajakolu (69%) i alkoholu wanilinowego (11%). Efektywną produkcję waniliny osiągnęli, izolując reduktazę

kwasów karboksylowych i prowadząc redukcję w warunkach *in vitro* [18].

Do produkcji waniliny z kwasu wanilinowego zdolny jest również rekombinowany szczep *E. coli* BL21-Codon-Plus®(DE3)-RP/pHAT305, u którego uzyskano ekspresję genów reduktazy kwasów karboksylowych (*car*) z *Nocardia* sp. NRRL 5646. Rekombinowane komórki *E. coli*, posiadające geny *car*, przy stężeniu 4 g/l kwasu wanilinowego, redukowały tylko 50% substratu do 0,1 g/l waniliny oraz 1,5 g/l alkoholu wanilinowego. Wzrost efektywności transformacji zaobserwowano, uzyskując dodatkowo ekspresję genu *ntp*, kodującego transferazę fosfopantoteinową, również pochodzącą z *Nocardia* sp. NRRL 5646. W tym przypadku redukcja była szybsza, około 80% dostarczonego kwasu wanilinowego ulegało transformacji w czasie 8 h i uzyskano 2,2 g/l waniliny oraz 0,5 g/l alkoholu wanilinowego. Najwyższą wydajność produkcji waniliny osiągnięto u *E. coli* BL21-Codon Plus®DE3)-RP/pPV2.85, zawierającej oprócz genów *car* i *ntp* dodatkowo *gdh*, gen kodujący glukozo-1-dehydrogenazę, pochodzącą z *Bacillus subtilis*. Ten szczep produkował maksymalną ilość waniliny w czasie 6 h [38].

Innym mikroorganizmem zdolnym do produkcji waniliny z kwasu wanilinowego jest nitkowaty grzyb *Pycnoporus cinnabarinus* MUCL39533. W warunkach naturalnych produkcja waniliny przez ten szczep jest jednak niska, a głównym metabolitem jest metoksyhydrochinon, produkt oksydacyjnej dekarboksylacji kwasu wanilinowego. Wykazano jednak, że dodatek do pożywki celobiozy ogranicza produkcję metoksyhydrochinonu i wpływa na wzrost produkcji waniliny [4].

Opatentowano biotechnologiczny proces produkcji waniliny z rolnych produktów ubocznych. Wanilinę otrzymano w wyniku dwuetapowego procesu biotechnologicznego, łączącego biotransformację kwasu ferulowego z wysłodków buraczanych do kwasu wanilinowego przez *Aspergillus niger* oraz biotransformację uzyskanego kwasu wanilinowego do waniliny przez *Pycnoporus cinnabarinus*. Inne rolne produkty uboczne, takie jak otręby ryżowe, również mogą być tanim źródłem kwasu ferulowego. Produkt uboczny, powstający podczas produkcji oleju z otrębów ryżowych, może być wykorzystany jako źródło kwasu ferulowego, przez mieszaną populację grzybów *A. niger* CGMCC0774 i *P. cinnabarinus* CGMCC1115. Kwas ferulowy jest przekształcany w kwas wanilinowy przez *A. niger* CGMCC0774, a *P. cinnabarinus* CGMCC1115 redukuje kwas wanilinowy do waniliny [17].

3. Synteza kwasu wanilinowego

W związku ze wzrastającym zapotrzebowaniem na naturalny aromat wanilinowy w przemyśle spożywczym, a także ograniczeniami prawnymi uniemożliwiającymi

stosowanie substancji syntetyzowanych chemicznie w aromatach naturalnych, pojawiło się duże zainteresowanie produkcją waniliny w procesach biotechnologicznych. Ponieważ kwas wanilinowy jest podstawowym substratem do produkcji waniliny, dlatego też istotne jest poznanie procesów biotechnologicznej syntezy i uwalniania tego związku z ligniny. Znane są zdolności mikroorganizmów do produkcji pochodnych kwasu hydroksybenzoesowego, m.in. kwasu wanilinowego z naturalnie występujących substratów, takich jak kwas ferulowy, eugenol i izoeugenol, na drodze biotransformacji.

3.1. Synteza kwasu wanilinowego z kwasu ferulowego

Kwas ferulowy(KF) jest ważnym składnikiem ligniny, a wiele roślin, m.in. z rodziny *Poaceae*, jak np. jęczmień (*Hordeum*), pszenica (*Triticum*), owies (*Avena*) czy kukurydza (*Zea*), wykazuje zdolność do akumulacji dużych ilości KF w ścianach komórkowych, w formie wolnej lub w postaci kowalencyjnie związanej z biopolimerami, takimi jak polisacharydy, alkohole triterpenowe oraz sterole roślinne. KF występuje w dużych ilościach w tradycyjnych, bezwartościowych odpadach gospodarczych, takich jak otręby i wysłodki buraczane [12, 13, 24, 40]. Wyizolowano wiele gatunków bakterii, drożdży, grzybów, a także glonów, zdolnych do syntezy kwasu wanilinowego, zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych, na drodze jednego z trzech podstawowych szlaków transformacji kwasu ferulowego, których podział opiera się na przebiegu pierwszej reakcji. W biotransformacji KF mogą również powstawać inne produkty, takie jak: wanilina, 4-hydroksy-3-metoksystryren, kwas *p*-kumarowy, alkohol wanilinowy oraz wanilinoamina [3, 6, 24, 36].

Pierwszy mechanizm transformacji kwasu ferulowego (rys. 1D) jest analogiczny do β -oksydacji kwasów tłuszczowych, i przebiega z wytworzeniem waniliny jako metabolitu pośredniego. Szlak ten jest zależny od CoA. Jednym z mikroorganizmów, zdolnym do wzrostu w obecności kwasu ferulowego, jako jedyne źródła węgla i energii, jest *Pseudomonas fluorescens*. Właściwości te stwierdzono u szczepów AN103 oraz BF13-97. *Pseudomonas fluorescens* BF13 wytwarzał 95% kwasu wanilinowego (6 g/l) z kwasu ferulowego w ciągu 5 godzin. Aby zwiększyć produkcję kwasu wanilinowego, stworzono linię mutantów inercyjnych, posiadających insert w genie *vanA*, kodującym α -podjednostkę demetylazy soli kwasu wanilinowego. Mutant ten został wykorzystany do przekształcania kwasu ferulowego do kwasu wanilinowego, uzyskując 0,23 g kwasu wanilinowego na godzinę na 1 g biomasy. W badaniach przeprowadzonych nad szczepem AN103, maksymalne stężenie kwasu wanilinowego w medium hodowlanym, 0,55 g/l,

stwierdzono w 16 godzinie prowadzenia hodowli. W pożywce nie zaobserwowano akumulacji waniliny, co świadczy o tym, że *P. fluorescens* AN103 wykazuje wysoką wydajność utleniania tego metabolitu [8, 24].

Zbadano przebieg reakcji biotransformacji kwasu ferulowego, prowadzącej do otrzymania kwasu wanilinowego. Wykazano, że reakcja przeprowadzana przez *P. fluorescens* jest dwuetapowa i zależy jest od CoA, ATP oraz $MgCl_2$. Pierwszym etapem transformacji KF jest jego aktywacja do feruilo-CoA, przeprowadzana przez ligazę kwas ferulowy-CoA. Podlega on następnie reakcji rozszczepienia łańcucha bocznego, której produktami są wanilina oraz acetylo-CoA. Etap ten jest całkowicie zależny od CoA, ATP oraz $MgCl_2$ (rys. 1D). Szczep *P. fluorescens* AN103, w obecności wymienionych kofaktorów, transformował 32% wprowadzonego do pożywki KF do waniliny (18%) i kwasu wanilinowego (14%) przed upływem 4 godzin. Dłuższa inkubacja powodowała wzrost stężenia kwasu wanilinowego i spadek stężenia waniliny. Rozszczepienie KF, przy braku CoA oraz ATP, nie następowało, natomiast niedobór $MgCl_2$ zmniejszał (do 10%) szybkość reakcji odszczepienia łańcucha bocznego. Dehydrogenaza wanilinowa, utleniająca wanilinę do kwasu wanilinowego jest enzymem zależnym od NAD^+ . Dodanie NAD^+ do pożywki zawierającej CoA, ATP oraz $MgCl_2$ powodowało u szczepu AN103 dwukrotne zwiększenie ilości przekształconego kwasu ferulowego (do 68%), a głównym produktem rozpadu był wówczas kwas wanilinowy [24].

G h o s h i wsp. [13], badając *Paecilomyces variotii* MTCC, wykazali, że grzyby te degradują KF do kwasu wanilinowego na drodze tego samego szlaku przemian, co bakterie z gatunku *P. fluorescens* i osiągnęli maksymalne stężenie kwasu wanilinowego, 115 mg/l, stosując 10 mM KF w pożywce, po 16 dniach inkubacji. Wyższą wydajność transformacji KF do kwasu wanilinowego zaobserwowano u *Streptomyces sannanensis* MTC 6637, a maksymalne stężenie kwasu wanilinowego, 400 mg/l, uzyskano, po 16 dniach prowadzenia hodowli, stosując jako źródło węgla KF w stężeniu 5 mM. Ilość kwasu wanilinowego utrzymywała się w pożywce przed długi czas na stałym poziomie, co pozwoliło na stwierdzenie, że szczep ten nie jest zdolny do dalszej transformacji kwasu wanilinowego [12]. T r i p a t h i i wsp. [36] prowadząc badania nad *Haematococcus pluvialis* uzyskali maksymalną produkcję kwasu wanilinowego, 5,4 mg/l, w trzecim dniu prowadzenia hodowli, stosując w pożywce 1 mM KF i wykorzystując komórki immobilizowane. Wykazali, że algi te zdolne są do transformacji KF do szeregu związków, występujących w aromacie wanilinowym, takich jak kwas wanilinowy, alkohol wanilinowy, kwas protokatechowy, kwas *p*-hydrobenzoesowy, aldehyd *p*-hydrobenzoesowy oraz kwas *p*-kumarowy. Reakcja transformacji KF do kwasu wanilinowego przebiegała szlakiem zależnym od CoA.

Podobny szlak przemian zaobserwowano u *Rhodotorula rubra*, gdzie dodatek CoA, ATP i NAD^+ do ekstraktu komórkowego był niezbędny w konwersji kwasu ferulowego do kwasu wanilinowego. Badania wykazały, że po 22 h prowadzenia hodowli 90% wszystkich produktów biotransformacji KF stanowił kwas wanilinowy, obserwowano jednak dalszą transformację kwasu wanilinowego do gwajakolu, kwasu protokatechowego i 4-hydroksy-3-metoksystyrenu [15].

W drugim szlaku syntezy kwasu wanilinowego z KF (rys. 1E) pierwszym etapem jest rozszczepienie C_1 łańcucha bocznego KF, przeprowadzane przez dekarboksylazę kwasu ferulowego, z wytworzeniem 4-hydroksy-3-metoksystyrenu (4-winylogwajakolu). Zaproponowany mechanizm dekarboksylacji obejmuje wstępną reakcję izomeryzacji kwasu ferulowego do pochodnej chinonu, która następnie ulega samorzutnej dekarboksylacji. Mechanizm ten jest zgodny z obserwacją, że grupa *p*-hydroksylowa jest niezbędna do procesu dekarboksylacji. 4-winylogwajakol ulega następnie przekształceniu w kwas wanilinowy, który w wyniku nieoksydacyjnej dekarboksylacji przechodzi w gwajakol. Przemiany te nie są zależne od CoA [35].

T o p a k a s i wsp. [35] przeprowadzili badania nad termofilnym grzybem *Sporotrichum termophile*. Wykazali, że u tego mikroorganizmu, produkcja kwasu wanilinowego z kwasu ferulowego zachodzi poprzez degradację łańcucha propionowego, z wytworzeniem 4-winylogwajakolu. W przeprowadzonych badaniach osiągnęli maksymalną wydajność syntezy kwasu wanilinowego, 4024 mg/l, hodując grzyby przez pierwsze 3 dni w pożywce zawierającej glukozę jako źródło węgla, a następnie dodając KF w stężeniu 60 mM. Kwas wanilinowy, otrzymany w wyniku transformacji, jest produktem nietrwałym, obserwowano więc jego nieoksydacyjną dekarboksylację do gwajakolu, zanim produkcja kwasu wanilinowego osiągnęła maksimum [24, 35]. Przemiany kwasu ferulowego do kwasu wanilinowego, przebiegające z wytworzeniem 4-winylogwajakolu jako metabolitu pośredniego, stwierdzono również u grzybów białej zgnilizny *Schizophyllum commune* [37].

W komórkach *Polyporus versicolor* podczas degradacji kwasu ferulowego, obok 4-winylogwajakolu wykryto również kwas wanilinowy, wanilinę, alkohol wanilinowy, gwajakol oraz katechol, a w komórkach szczepów *Paecilomyces variotii* i *Pestalotia palma rum* wykazano również metoksyhydrochinon jako produkt oksydacyjnej dekarboksylacji kwasu wanilinowego. *Bacillus coagulans* BK07 przeprowadzał dekarboksylację kwasu ferulowego do 4-winylogwajakolu, który był natychmiast konwertowany do waniliny i utleniany do kwasu wanilinowego. Kwas wanilinowy z kolei ulegał demetylacji do kwasu protokatechowego [29].

Trzeci mechanizm syntezy kwasu wanilinowego (rys. 1F) polega na skróceniu łańcucha bocznego kwasu

ferulowego, w wyniku czego powstaje kwas dihydroferulowy (kwas 4-hydroksy-3-metoksyfenylopropionowy). Redukcja łańcucha bocznego rozpoczyna się od ataku kationu wodorkowego, pochodzącego z pochodnej chinonu, zainicjowanego przez izomeryzację analogiczną do tej zachodzącej podczas dekarboksylacji kwasu ferulowego. Reakcja ta jest typowa dla organizmów beztlenowych, takich jak *Burkholderia cepacia*, *Wolinella succinogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Lactobacillus plantarum*. Reakcja ta zachodzi jednak również w warunkach tlenowych i przeprowadzana jest przez *Phanerochaete chrysosporium* i *Pseudomonas fluorescens* FE2. U *Wolinella succinogenes* kwas dihydroferulowy jest metabolizowany do kwasu wanilinowego, *p*-karboksymetylofenolu i kwasu homowanilinowego. U *P. fluorescens* zaobserwowano szlak przechodzący przez kwas wanilinowy i protokatechowy [26, 29].

3.2. Synteza kwasu wanilinowego z eugenolu i izoeugenolu

Proces otrzymywania kwasu wanilinowego oraz waniliny na drodze biotransformacji kwasu ferulowego jest najbardziej powszechny, a zdolność do tej transformacji wykazuje wiele mikroorganizmów. Zidentyfikowano jednak szczepy bakteryjne produkujące kwas wanilinowy z innych, tańszych pochodnych fenolu, takich jak eugenol oraz izoeugenol (rys. 1G, H). Eugenol oraz izoeugenol są składnikami olejków eterycznych. Eugenol może być otrzymywany na skalę przemysłową z drzewa goździkowego *Syzygium aromaticum* [27, 32].

Eugenol jest silnie toksyczny dla większości bakterii, istnieją jednak szczepy zdolne do jego biotransformacji. Do bakterii transformujących eugenol należą m.in. różne szczepy *Pseudomonas*, które posiadają oksydazę eugenolową, enzym odpowiedzialny za pierwszy etap rozkładu, prowadzący do otrzymania alkoholu koniferylowego. Reakcję tą może również katalizować oksydaza alkoholu wanilinowego, enzym obecny m.in. u *Penicillium simplicissimum*. Alkohol koniferylowy ulega następnie utlenieniu do aldehydu koniferylowego, w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę alkoholu koniferylowego. Dehydrogenaza aldehydu koniferylowego katalizuje kolejną reakcję, w wyniku której powstaje kwas ferulowy. KF jest przekształcany w wanilinę oraz kwas wanilinowy w szlaku zależnym od CoA [27]. Przemiany eugenolu prowadzące do kwasu ferulowego, a następnie kwasu wanilinowego przedstawiono na rysunku 1C, D i G.

O verhage i wsp. [27] wyizolowali szczep *Escherichia coli* XL1-Blue, tolerujący eugenol. Konstruując plazmid zawierający geny oksydazy alkoholu wanilinowego, dehydrogenazy alkoholu koniferylowego oraz dehydrogenazy aldehydu koniferylowego, pochodzące z *Penicillium simplicissimum* CBS 170.90, a następnie

transformując nim wyizolowany szczep *E. coli*, uzyskali wydajną transformację eugenolu do kwasu ferulowego. Dalszą przemianę KF uzyskali transformując ten sam szczep *E. coli* genami kodującymi ligazę kwas ferulowy-CoA oraz hydratazę enoilo-CoA [27].

Pseudomonas putida I58 i *Bacillus subtilis* B2 są szczepami bakteryjnymi, transformującymi izoeugenol do kwasu wanilinowego. Wykazano, że bakterie te wykorzystują wanilinę oraz kwas wanilinowy jako źródło węgla, natomiast alkohol koniferylowy, aldehyd koniferylowy i KF, które są intermediatami transformacji eugenolu, nie były rozkładane. Wyniki te sugerują, że izoeugenol jest bezpośrednio przekształcany w wanilinę, bez wytwarzania kwasu ferulowego [10]. Transformacja izoeugenolu do kwasu wanilinowego, przeprowadzana przez *P. putida* I58 była bardziej efektywna niż u *B. subtilis* B2. Komórki szczepu *P. putida*, rosnące w optymalnej pożywce, zawierającej 5 g/l izoeugenolu, przekształcały izoeugenol do kwasu wanilinowego z wydajnością 98% przed upływem 40 minut. W pożywce zidentyfikowano znikome ilości waniliny. *B. subtilis* przeprowadzał tą reakcję wolniej, a maksymalna ilość waniliny osiągnięta była po 24 godzinach hodowli. Wydajność transformacji izoeugenolu do waniliny w optymalnych warunkach wynosiła 14%. Obserwowano późniejsze utlenianie waniliny do kwasu wanilinowego [10, 32]. Transformację izoeugenolu do waniliny zaobserwowali również Sehardi i wsp. [31] u szczepu *Nocardia iowensis*. W pierwszym etapie izoeugenol jest przekształcany przy udziale monooksygenazy izoeugenolu do epoksydu (rys. 1H), który jest hydrolizowany do diolu, a następnie transformowany do waniliny (rys. 1I).

4. Podsumowanie

W pracy przedstawiono dotychczasowy stan wiedzy na temat mikrobiologicznych przemian kwasu wanilinowego. Podstawową reakcją rozkładu kwasu wanilinowego jest jego demetylacja do kwasu protokatechowego. U bakterii zidentyfikowano dwa różne szlaki, którymi może przebiegać ta reakcja, oksydacyjny, zależny od NAD(P)H oraz nieoksydacyjny, w którym kofaktorem jest tetrahydrofolian. Inną ważną przemianą kwasu wanilinowego jest reakcja nieoksydacyjnej dekarboksylacji do gwajakolu. Dekarboksylaza kwasu wanilinowego, enzym katalizujący tą przemianę, nie wymaga żadnych kofaktorów.

Największe znaczenie przemysłowe ma jednak redukcja kwasu wanilinowego do waniliny. Ten dwuetapowy proces ten występuje powszechnie u licznych gatunków bakterii i grzybów. Reduktaza kwasów karboksylowych wymagana do pełnej aktywności obecności ATP, CoA oraz NADPH. Z punktu widzenia syntezy waniliny, istotne jest poznanie szlaków biosyntezy jej

prekursora z innych naturalnych, powszechnie występujących związków. Kwas wanilinowy otrzymuje się najczęściej na drodze biotransformacji kwasu ferulowego, ważnego składnika ligniny. Reakcja ta może przebiegać dwoma alternatywnymi szlakami. Pierwszy z nich, zależny od CoA, przebiega z wytworzeniem waniliny jako metabolitu pośredniego i jest charakterystyczny dla wielu szczepów bakterii, grzybów oraz alg. Drugi szlak biosyntezy kwasu waniliowego z kwasu ferulowego polega na dwukrotnej dekarboksylacji, której intermedyatem jest 4-hydroksy-3-metoksystyren. Zidentyfikowano również szczepy mikroorganizmów produkujące kwas waniliowy z innych pochodnych fenolu, takich jak eugenol oraz izoeugenol. Transformacja eugenolu przebiega z wytworzeniem kwasu ferulowego, natomiast izoeugenol jest bezpośrednio transformowany do waniliny.

Piśmiennictwo

1. Abe T., Masai E., Miyauchi K., Katayama Y., Fukuda M.: A tetrahydrofolate-dependent O-demethylase, LigM, is crucial for catabolism of vanillate and syringate in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bacteriol.* **187**, 2030–2037 (2005)
2. Alvarez-Rodriguez M.L., Belloch C., Villa M., Uruburu E., Larriba G., Coque J.J.R.: Degradation of vanillic acid and production of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**, 49–55 (2003)
3. Ashengroph M., Nhavi I., Zarkesh-Esfahani H., Momenbik E.: Novel strain of *Bacillus licheniformis* SHL1 with potential converting ferulic acid into vanillic acid. *Ann. Microbiol.* **62**, 553–558 (2012)
4. Bonnin E., Lesage-Meessen L., Asther M., Tibault J.F.: Enhanced bioconversion of vanillic acid into vanillin by the use of natural cellobiose. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 484–486 (1999)
5. Bykova M.V., Ermakov D.Yu., Kaichev V.V., Bulavchenko O.A., Saraev A.A., Lebedev M.Yu., Yakovlev V.A.: Ni-based sol-gel catalysts as promising system for crude bio-oil upgrading: guaiacol hydrodeoxygenation study. *Appl. Catal. B: Environ.* **113–114**, 296–307 (2012)
6. Chamkha M., Record E., Garcia J.-L., Asther M. L., Labat M.: Isolation from a shea cake digester of a tannin-tolerant *Escherichia coli* strain decarboxylating *p*-hydroxybenzoic and vanillic acids. *Curr. Microbiol.* **44**, 341–349 (2002)
7. Chow K.T., Pope M.K., Davies J.: Characterization of a vanillic acid non-oxidative decarboxylation gene cluster from *Streptomyces* sp. D7. *Microbiology*, **145**, 2393–2403 (1999)
8. Civolani C., Barghini P., Roncetti A.R., Ruzzi M., Schiesser A.: Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by means of a vanillate-negative mutant of *Pseudomonas fluorescens* Strain BF13. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2311–2317 (2000)
9. Dhar A., Lee K.S., Dhar K., Rosazza J.P.N.: *Nocardia* sp. vanillic acid decarboxylase. *Enzyme. Microbiol. Technol.* **41**, 171–177 (2007)
10. Furukawa H., Morita H., Yoshida T., Nagasawa T.: Conversion of isoeugenol into vanillic acid by *Pseudomonas putida* 158 cells exhibiting high isoeugenol-degrading activity. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 401–403 (2003)
11. Gawlik-Dziki U.: Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności. *Żywność*, **4**, 29–40 (2004)
12. Ghosh S., Sachan A., Kumar Sen S., Mitra A.: Microbial transformation of ferulic acid to vanillic acid by *Streptomyces sannanensis* MTCC 6637. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 131–138 (2007)
13. Ghosh S., Sachan A., Mitra A.: Research communications – Formation of vanillic acid from ferulic acid by *Paecilomyces variotii* MTCC 6581. *Curr. Sci.* **90**, 825–829 (2006)
14. Harborne J.B.: Ekologia biochemiczna. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 1997
15. Huang Z., Dostal L., Rosazza J.P.N.: Mechanisms of ferulic acid conversions to vanillic acid and guaiacol by *Rhodotorula rubra*. *J. Biol. Chem.* **268**, 23954–23958 (1993)
16. Karegoudar T.B., Kim C.-K.: Microbial degradation of mono-hydroxybenzoic acids. *J. Microbiol.* **38**, 53–61 (2000)
17. Lesage-Meessen L., Delattre M., Haon M., Thibault J.F., Ceccaldi B.C., Brunerie P., Asther M.: Two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *J. Biotechnol.* **50**, 107–113 (1996)
18. Li T., Rosazza J.P.N.: Biocatalytic synthesis of vanillin. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 684–687 (2000)
19. Masai E., Katayama Y., Nishikawa S., Fukuda M.: Characterization of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 genes involved in degradation of lignin-related compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 364–373 (1999)
20. Mattila P., Hellstrom J.: Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *J. Food Compos. Anal.* **20**, 152–160 (2007)
21. McMurry J.: Chemia organiczna. Część I, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2000, s. 573
22. Mitsui R., Kusano Y., Yurimoto H., Sakai Y., Kato N., Tanaka M.: Formaldehyde fixation contributes to detoxification for growth of a nonmethylotroph, *Burkholderia cepacia* TM1, on vanillic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6128–6132 (2003)
23. Morawski B., Segura A., Ornston L.N.: Substrate range and genetic analysis of *Acinetobacter* vanillate demethylase. *J. Bacteriol.* **182**, 1383–1389 (2000)
24. Narbad A., Gasson M.J.: Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel CoA-dependent pathway in a newly isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology*, **144**, 1397–1405 (1998)
25. Nishimura M., Ooi O., Davies J.: Isolation and characterization of *Streptomyces* sp. NL15-2K capable of degrading lignin-related aromatic compounds. *J. Biosci. Bioeng.* **102**, 124–127 (2006)
26. Noor Hasyierah M.S., Zulkali M.M.D., Ku Syahidah K.I.: Ferulic acid from lignocellulosic biomass: Review. Proceedings of MUCET 2008, Putra Brasmana, Perlis, Malaysia
27. Overhage J., Steinbuechel A., Priefert H.: Highly efficient bio-transformation of eugenol to ferulic acid and further conversion to vanillin in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6569–6576 (2003)
28. Priefert H., Rabenhorst J., Steinbuechel A.: Molecular characterization of genes of *Pseudomonas* sp. strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate. *J. Bacteriol.* **179**, 2595–2607 (1997)
29. Priefert H., Rabenhorst J., Steinbuechel A.: Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 296–314 (2001)
30. Providenti M.A., O'Brien J.M., Ruff J., Cook A.M., Lambert I.B.: Metabolism of isovanillate, vanillate, and veratrate by *Comamonas testosterone* strain BR6020. *J. Bacteriol.* **188**, 3862–3869 (2006)
31. Seshadri R., Lamm A.S., Khare A., Rosazza J.P.N.: Oxidation of isoeugenol by *Nocardia iowensis*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **43**, 486–494 (2008)
32. Shimoni E., Ravid U., Shoham Y.: Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin. *J. Biotech.* **78**, 1–9 (2000)

33. Szwajgier D., Pielecki J., Targoński Z.: Antioxidant activities of cinnamic and benzoic acid derivatives. *Acta Sci. Pol.* **4**, 129–142 (2005)
34. Tai A., Sawano., Yazama F.: Antioxidant properties of ethyl vanillin *in vitro* and *in vivo*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 2346–2350 (2011)
35. Topakas E., Kalogeris E., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P.: Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by the thermophilic fungus *Sportrichum thermophile*. *Lebensm.-Wissu.-Technol.* **36**, 561–565 (2003)
36. Tripathi U., Rao S.R., Ravishankar G.A.: Biotransformation of phenylpropanoid compounds to vanilla flavor metabolites in cultures of *Haematococcus pluvialis*. *Process Biochem.* **38**, 419–426 (2002)
37. Tsuijyama S. Ueno M.: Formation of 4-vinyl guaiacolas an intermediate in bioconversion of ferulic acid by *Schizophyllum commune*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 212–215 (2008)
38. Venkatasubramanian P., Daniels L., Das S., Lamm A.S., Rosazza J.P.N.: Aldehyde oxidoreductase as a biocatalyst: Reductions of vanillic acid. *Enzyme Microbial. Technol.* **42**, 130–137 (2008)
39. Venkatasubramanian P., Daniels L., Rosazza J.P.N.: Reduction of carboxylic acids by *Nocardia* aldehyde oxidoreductase requires a phosphopantetheinylated enzyme. *J. Biol. Chem.* **282**, 478–485 (2007)
40. Zheng L., Zheng P., Sun Z., Bai Y., Wang J., Guo X.: Production of vanillin from waste residue of rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Bioresour. Technol.* **98**, 1115–1119 (2007)