

Danuta WOJCIESZYŃSKA, Urszula GUZIK, Piotr JAROSZEK

Uniwersytet Śląski, Katedra Biochemii, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice
urszula.guzik@us.edu.pl

Mikrobiologiczny rozkład kwasu galusowego

Kwas galusowy należy do grupy roślinnych związków zwanych polifenolami. Związek ten występuje w roślinach w postaci wolnej i związanej w estrach. Rozkład GA zachodzi zarówno w tlenowych, jak i beztlenowych warunkach, a główną rolę w jego degradacji odgrywają mikroorganizmy. Kluczowymi enzymami tlenowej degradacji GA są, należące do oksygenaz, dioksygenazy rozszczepiające, katalizujące rozpad pierścienia aromatycznego z udziałem tlenu. Tlenowa degradacja kwasu galusowego u bakterii może zachodzić szlakiem *meta*, inicjowanym przez dioksygenazę galusanową i 4,5-dioksygenazę protokatechową, lub szlakiem *orto*, zapoczątkowanym aktywnością 3,4-dioksygenazy protokatechowej. Produktami rozkładu GA stwierdzonymi u *Pseudomonas putida* są pirogronian i szczawiooctan. Rozkład GA z udziałem tlenu powiązany jest również ze szlakiem β -ketoadypinowym kwasu protokatechowego, którego końcowymi produktami są acetylo-CoA i bursztynilo-CoA. Stwierdzono także obecność tlenowej degradacji GA u grzybów.

Głównymi związkami przejściowymi beztlenowej degradacji GA są floroglucyna oraz rezorcyna. Kluczowym produktem przejściowym w degradacji kwasu galusowego poprzez floroglucynę jest 3-hydrokso-5-ketoheksanian (HOHN). Rezorcyna, drugi produkt przejściowy beztlenowej degradacji GA, powstaje z floroglucyny i pirogalolu przez dehydroksylację. Związek ten może ulegać następnie redukcji z udziałem reduktazy rezorcynowej lub hydrolizie do kwasu 5-keto-2-heksenowego.

Słowa kluczowe: kwas galusowy, bakterie, degradacja

Wprowadzenie

Kwas galusowy (ang. gallic acid - GA) to organiczny hydrokso kwas będący trójhydroksoylową pochodną kwasu benzoowego, w której grupy hydroksoylowe znajdują się w położeniu *meta* i *para* względem grupy karboksylowej. Związek ten należy do grupy polifenoli, będących jednymi z głównych wtórnych metabolitów roślin. Polifenole pełnią w świecie roślin wiele istotnych funkcji związanych z ochroną przed bakteriami, grzybami i patogenami, a także odpowiedzialne są za nadawanie barw kwiatom i owocom [1]. Ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne, takie jak zdolność do szybkiego wiązania tlenu, kompleksowania metali, zdolności do tworzenia estrów, kwas galusowy jest prekursorem wielu związków biologicznie czynnych, w tym tanin hydrolizujących i skondensowanych. Znalazł on szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, farmaceutyce i medycynie. Jest wykorzystywany w produkcji barwników, farb, wywoływaczy w fotografii. Stosowany jest również w pirotechnice. Szeroko wykorzystywany jest do produkcji estrów: galusanów propylenu, dodecyli i oktyli dodawanych do produktów spożywczych i farmaceutycznych. W medycynie GA stosuje się do walki

z nowotworami, cukrzycą, chorobami zapalnymi i licznymi chorobami skóry. Jako silny antyutleniacz wspólnie z kwasem askorbinowym, tokoferolami i karotenoidami zabezpiecza organizm ludzki przed stresem oksydacyjnym [2-4].

Coraz częstsze wykorzystanie kwasu galusowego spowodowało wzrost jego ilości w środowisku, wynikający z zanieczyszczenia wód ściekami przemysłowymi. Woda taka nie nadaje się do celów spożywczych ze względu na nieprzyjemny smak i zapach oraz powodowanie zatruc. Dawka LD₅₀ dla kwasu galusowego opracowana dla królika wynosi 2,8 g na kilogram masy ciała [5-7]. Brak jest jednak danych dotyczących stężenia polifenoli w środowisku (w tym kwasu galusowego), co wynika z trudności w analizie próbek o bardzo złożonym składzie [5]. Jednocześnie obecność organizmów zdolnych do rozkładu kwasu galusowego pozwala na zachowanie stałego, bezpiecznego poziomu tego kwasu w środowisku. Podobieństwo strukturalne kwasu galusowego do innych wysokotoksycznych związków fenolowych być może umożliwi jego wykorzystanie jako substancji wspomagającej procesy rozkładu trudno degradowalnych związków poprzez indukcję wspólnych szlaków rozkładu [8]. Aby jednak było to możliwe, niezbędne jest poznanie dróg degradacji GA, które, jak się okazało, mogą zachodzić zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych, przez mikroorganizmy. Stąd celem pracy było przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat mikrobiologicznego rozkładu kwasu galusowego ze szczególnym uwzględnieniem indukcji enzymów degradacyjnych, wspólnych dla rozkładu kwasu galusowego i ksenobiotycznych związków aromatycznych.

Rozkład kwasu galusowego

Rozkład roślinnych związków aromatycznych, a zatem również zaliczanego do nich kwasu galusowego, zajmuje znaczącą pozycję w hierarchii procesów związanych z obiegiem węgla na Ziemi. Areny, ze względu na obecność pierścienia aromatycznego, charakteryzują się wysoką stabilnością, co jest utrudnieniem w jego biologicznej degradacji. Wynika to z obecności zdelokalizowanych elektronów znajdujących się na niehybrydizowanych orbitalach typu *p*. Każdy z atomów węgla posiada jeden równocenny niehybrydizowany orbital z elektronem. Orbitale typu *p* oddziałują z dwoma sąsiadującymi orbitalami tego samego typu, co w konsekwencji prowadzi do delokalizacji elektronów w obrębie pierścienia. W ten sposób płaska struktura pierścienia z góry i z dołu pokryta jest chmurą elektronów, które swoją obecnością utrudniają dotarcie do wiązań C-C i wpływają na stabilność arenów. Dodatkowo obecność podstawników wpływa na reaktywność pierścienia. Kwas galusowy posiada w swojej budowie dwa typy podstawników: grupa hydroksylowa należy do podstawników I grupy, silnie aktywujących pierścień na elektrofilowy atak enzymów z grupy oksygenaz, co ułatwia jego mikrobiologiczną degradację, jednocześnie zwiększając toksyczność związku. Grupa karboksylowa natomiast zmniejsza toksyczność względem mikroorganizmów, równocześnie działając dezaktywująco na pierścień [9-11].

Rośliny oraz zwierzęta posiadają zdolność do modyfikacji struktury pierścienia aromatycznego. Najczęstszym sposobem detoksykacji i transformacji arenów w organizmach zwierzęcych jest sprzężanie ksenobiotyków z kwasem glukuronowym [12]. Przemiany kwasu galusowego u roślin prowadzą najczęściej do produkcji metabolitów wtórnych, w tym powszechnie występujących tanin. U roślin i zwierząt nie obserwuje się jednak procesów prowadzących do całkowitego utlenienia kwasu galusowego [9]. Stanowi to domenę mikroorganizmów, w szczególności bakterii i grzybów, które wykształciły kataboliczne szlaki rozkładu związków aromatycznych, zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Mikroorganizmy posiadają również zdolność wykorzystywania aromatycznych związków jako źródło węgla i energii [13]. Warto zaznaczyć, że kwas galusowy mimo swoich bakteriostatycznych właściwości związanych z nieodwracalnymi reakcjami z białkami jest degradowany przez bakterie. Szczegółowe badania nad bakteryjną degradacją GA przeprowadził w 1980 r. Deschamps, który wyizolował dziewięć szczepów z rodzajów: *Bacillus*, *Staphylococcus* i *Klebsiella*, rosnących na pożywkach zawierających GA [9, 14]. Zaobserwowano, że szybkość rozkładu kwasu galusowego przez mikroorganizmy zależy od zastosowanego szczepu oraz warunków degradacji. Mendonça i inni zaobserwowali rozkład wyższej dawki kwasu galusowego (200 mg/l), jeżeli w pożywce był obecny jedynie kwas galusowy, natomiast wprowadzenie do pożywki mieszaniny innych związków aromatycznych obniżyło czterokrotnie zdolności degradacyjne *Fusarium flocciferum* (50 mg/l) [15]. Z kolei O'Donovan i Brooker badali szczep *Streptococcus gallolyticus* o wyjątkowych zdolnościach degradacyjnych kwasu galusowego. Szczep ten w ciągu 30 minut degradował 50 mM tego związku. Warunkiem uzyskania tak szybkiego rozkładu wprowadzonej dawki GA było jednak zastosowanie odpowiedniej temperatury (25°C) [16].

Tlenowa degradacja kwasu galusowego

W tlenowej degradacji związków aromatycznych zaangażowane są enzymy z grupy oxygenaz. Mają one zdolność aktywacji pierścienia aromatycznego podczas elektrofilowego ataku tlenu. W pierwszym etapie dochodzi zazwyczaj do hydroksylacji pierścienia z wytworzeniem jednego z czterech głównych produktów przejściowych: katecholu, kwasu protokatechowego, kwasu gentyzynowego lub hydroksychinonu. Enzymy zaangażowane w tym procesie należą do odpowiednich mono- lub dioksygenaz. W drugim etapie dochodzi do rozszczepienia pierścienia aromatycznego z udziałem dioksygenaz rozszczepiających [11, 14, 17]. Ze względu na lokalizację miejsca rozszczepienia dioksygenazy możemy podzielić na intradiolowe i ekstradiolowe, gdzie dioksygenazy intradiolowe stanowią enzymy szlaku *orto*, natomiast ekstradiolowe szlaku *meta*. Rozszczepienie pierścienia wraz z kolejnymi przemianami prowadzi do powstania alifatycznego produktu, będącego jednym z głównych metabolitów cyklu Krebsa (np. acetylo-CoA lub bursztynianu) [11, 14, 18].

Na uwagę zasługuje fakt, że kwas galusowy jest induktorem różnego typu dioksygenaz, które mogą być równocześnie zaangażowane w rozkład trudno degradowalnych związków aromatycznych szeroko stosowanych w przemyśle, np. jako barwniki, konserwanty, środki impregnujące, wybielacze, i z tego względu stanowiących duży problem środowiskowy. Wykorzystanie GA jako induktora enzymów degradacyjnych może ułatwić biodegradację ksenobiotyków. Obecnie prowadzone są badania nad zastosowaniem roślinnych związków fenolowych w układach kometabolicznych. Jako kometabolity stosuje się związki silnie toksyczne i niezwykle odporne na mikrobiologiczny rozkład, takie jak nitrofenole, chlorofenole [8]. Wprowadzanie do takich układów kwasu galusowego może przyczynić się do wzrostu biomasy, indukcji enzymów, produkcji odpowiednich form kofaktorów, co w konsekwencji może prowadzić do szybszego oczyszczania środowiska z uciążliwych zanieczyszczeń. Obiecujące wyniki uzyskano już podczas stosowania układów kometabolicznych fenolowych związków roślinnych, takich jak kwas protokatechowy czy 3,4-dihydroksybenzoesowy, z nitrofenolami [8]. Poznanie szlaków mikrobiologicznego rozkładu GA może przyczynić się do dalszego rozwoju badań nad kometabolicznym rozkładem ksenobiotyków.

Mikrobiologiczna degradacja kwasu galusowego z udziałem tlenu polega na konwersji GA do pirogronianu i szczawiooctanu. Ze względu na obecność trzech grup hydroksylowych w strukturze GA nie jest wymagany etap hydroksylacji pierścienia. Rozkład jest inicjowany przez dioksygenazę galusanową, w wyniku czego dochodzi do rozszczepienia pomiędzy C4 i C5 (rozszczenie *meta*) z wytworzeniem kwasu 4-karboksy-2-hydroksy-*cis,cis*-mukonowego [19, 20]. Do powstałego związku przyłączana jest cząsteczka wody, a produktem reakcji jest kwas 4-karboksy-4-hydroksy-2-ketoadypinowy szybko ulegający rozpadowi przy udziale aldolazy do pirogronianu i szczawiooctanu. Szczawiooctan w obecności NADH oraz dehydrogenazy jabłczanowej przekształcany jest do pirogronianu [20].

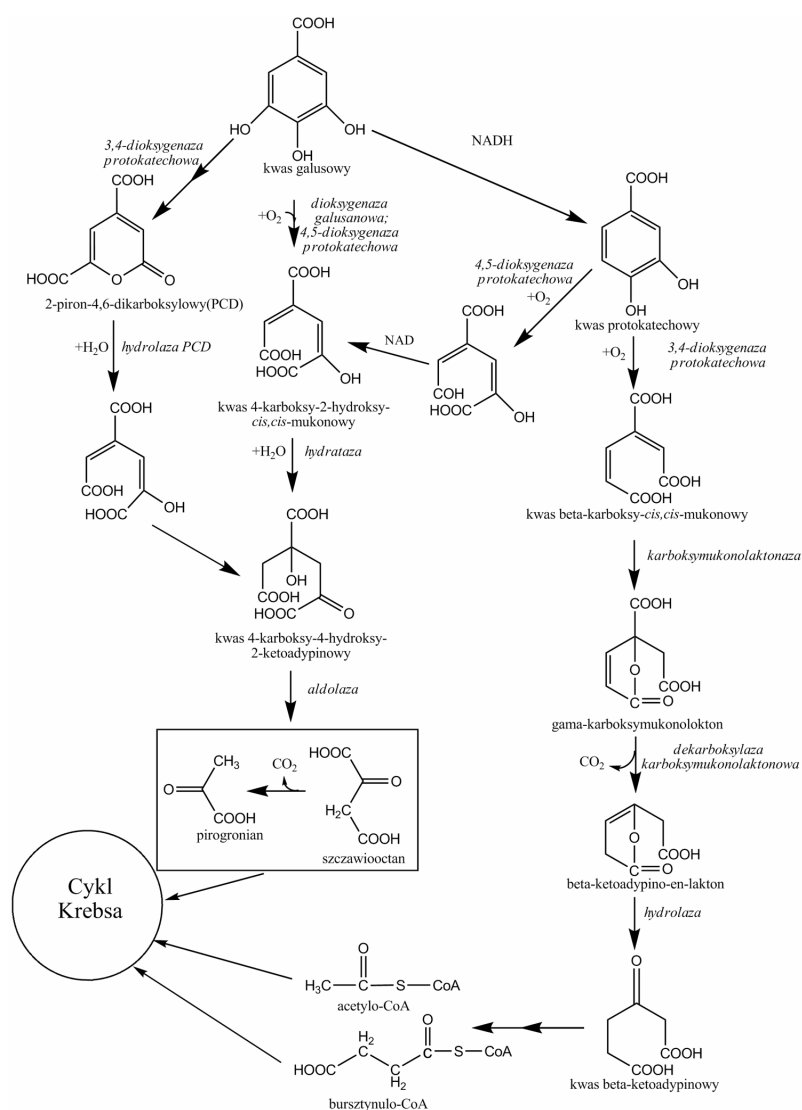
Sparnins i Dagley w badaniach nad szczepem *Pseudomonas putida*, indukowanym kwasem 3,5-O-metylogalusowym, zaobserwowali występowanie dwóch typów dioksygenaz. Oprócz dioksygenazy galusanowej występowała u tego szczepu również 4,5-dioksygenaza protokatechowa [18]. Nie obserwowano różnic w rozkładzie GA z udziałem obu typów dioksygenaz.

Rozkład kwasu galusowego, katalizowany przez 3,4-dioksygenazę protokatechową, prowadzi do rozszczepienia typu *orto*. Produktem pośrednim tej reakcji jest kwas 2-piron-4,6-dikarboksylowy (PCD), który pod wpływem hydrolazy przekształcany jest do kwasu 4-karboksy-4-hydroksy-2-ketoadypinowego, wspólnego produktu przejściowego dla szlaków intra- i ekstradiolowych [18, 21].

W obecności NADH kwas galusowy ulega redukcji do kwasu protokatechowego [22]. Kwas ten ulega rozpadowi szlakiem β -ketoadypinowym, który rozpoczyna się rozszczepieniem z udziałem dioksygenazy 3,4-protokatechowej, w wyniku czego powstaje kwas β -karboksy-*cis,cis*-mukonowy [11, 19, 23]. Związek ten ulega izomeryzacji do γ -karboksymukonolaktonu, prowadzonej przez karboksymukonolaktonazę. Następnie w wyniku dekarboksylacji powstaje β -ketoadypino-en-lakton [23]. Pod wpływem odpowiedniej hydrolazy ulega on konwersji do kwasu

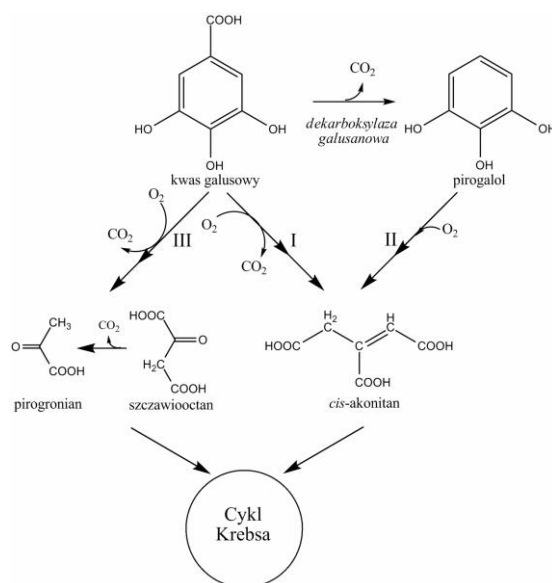
β -ketoadypinowego, którego aktywacja prowadzi do powstania β -ketoadypino-CoA. Związek ten pod wpływem tiolazy rozpada się do acetylo-CoA i bursztynulo-CoA [11, 23].

Kwas protokatechowy, powstały poprzez redukcję kwasu galusowego, może również podlegać rozszczepieniu przez 4,5-dioksygenazę protokatechową. Dioksygenaza ta indukuje dehydrogenazę semialdehydu kwasu 2-hydroksy-4-karboxymukonowego, będącego produktem rozszczepienia ekstradiolowego kwasu protokatechowego, dzięki czemu semialdehyd zostaje włączony w szlak rozpadu *meta* kwasu galusowego [18]. Szlaki tlenowej degradacji kwasu galusowego przez bakterie przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Szlaki tlenowej degradacji kwasu galusowego [18-21, 23]

Innymi drogami przebiega rozkład kwasu galusowego u grzybów [9]. W pierwszym etapie dochodzi do oksydacyjnego rozszczepienia z równoczesną dekarboksylacją, w wyniku czego powstaje kwas *cis*-akonitowy włączany w cykl Krebsa. Proces ten obserwowano u *Aspergillus niger*, który metabolizuje również GA poprzez dekarboksylację do pirogalolu [9, 13]. Związek ten ulega oksydacyjnemu rozszczepieniu do *cis*-akonitanu. Natomiast u *Aspergillus flavus* opisano szlak rozkładu kwasu galusowego, który prowadzi do pirogronianu i szczawiooctanu [9]. Schemat rozkładu GA u grzybów przedstawiono na rysunku 2.

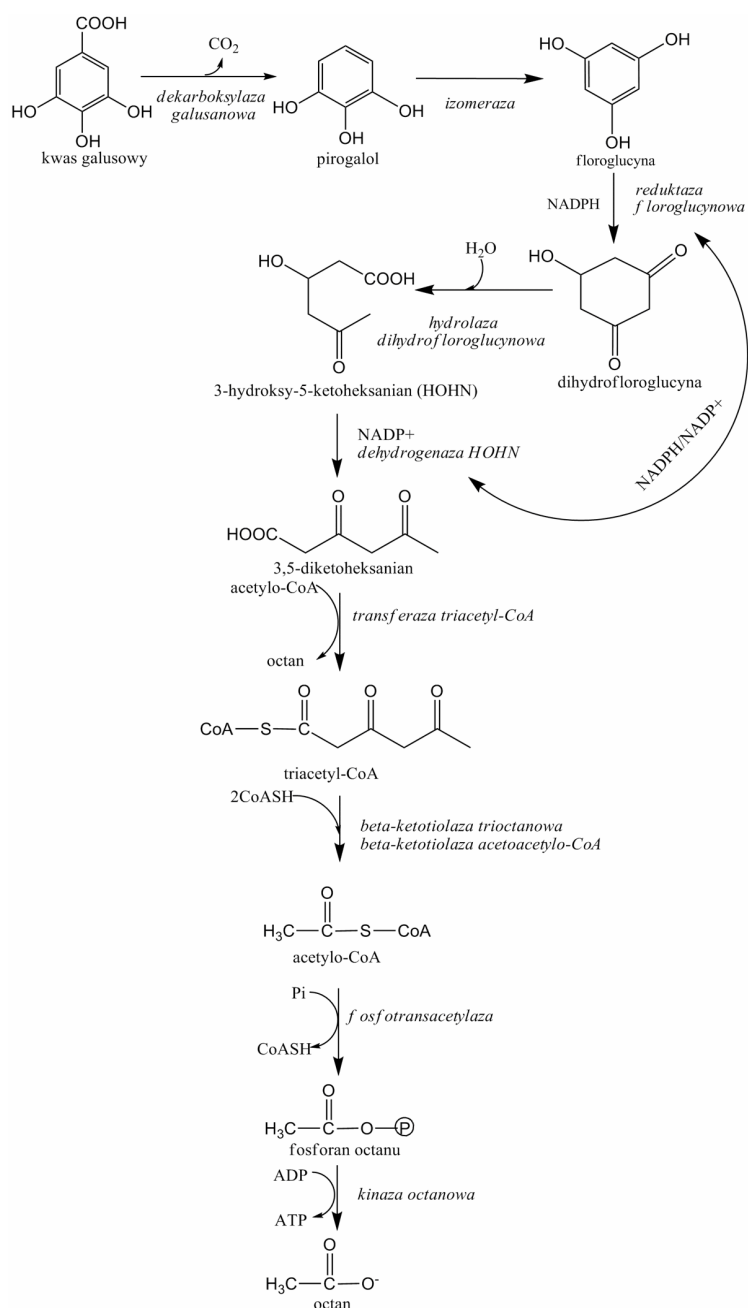


Rys. 2. Szlaki tlenowej degradacji GA u grzybów (I i II - *Aspergillus niger*, III - *Aspergillus flavus*) [9]

Beztlenowa degradacja kwasu galusowego

Istnieją organizmy degradujące kwas galusowy w warunkach beztlenowych [24]. Reakcją zapoczątkującą proces beztlenowego rozkładu GA jest jego dekarboksylacja, przeprowadzana przez dekarboksylazę galusanową o różnej specyficzności substratowej, w wyniku której powstaje pirogalol [9, 14, 25, 26]. Powstały pirogalol przekształcany jest do jednego z dwóch kluczowych produktów przejściowych: floroglucyny lub rezorcyny [9, 14]. Floroglucyna powstaje w wyniku *paratranshydroksylacji* wewnątrz- i międzycząsteczkowej [27]. Reakcje prowadzone przez *transhydroksylazy* polegają na redukcyjnym odłączeniu grupy hydroksylowej od cząsteczki donora z jednoczesnym przyłączeniem jej do akceptora. Następnie floroglucyna redukowana jest w obecności NADPH do dihydrofloroglucyny (1,3-diketo-5-hydroksy-cykloheksanu) [9, 14, 28, 29]. Powstały w efekcie aktywności reduktazy floroglucynowej NADP⁺ może ulec regeneracji przez hydrogenazę lub dehydrogenazę mrówczanową. Zjawisko to zaobserwowano u *Eubacte-*

rium oxidoreducens i stanowi ono element pośredniego połączenia aktywności katalitycznych: utlenienia mrówczanu, bądź wodoru, z redukcją floriglucyny. Występowanie tego połączenia jest faworyzowane w środowiskach, w których znajduje się znaczna ilość substancji ulegających reakcji redukcji [14, 26].



Rys. 3. Rozkład beztlenowy kwasu galusowego przez szczep *Pelobacter acidigallici* [9, 14]

W wyniku hydrolizy dihydrofloroglucyny powstaje 3-hydroksy-5-ketoheksanian (HOHN), stanowiący punkt rozgałęzienia szlaków beztlenowego rozkładu kwasu galusowego [9, 14, 26]. Zależna od NADP^+ dehydrogenaza HOHN przekształca 3-hydroksy-5-ketoheksanian do 3,5-diketoheksanianu (trioctanu). W etapie tym dochodzi do regeneracji NADPH wykorzystanego podczas redukcji floroglucyny, dzięki czemu tworzy się wewnętrzny obieg NADP^+ -NADPH [9, 26]. Trioctan włączany jest w ciąg przemian katalizowanych kolejno przez: transferazę triacetylo-CoA, β -ketotiolazę trioctanową, β -ketotiolazę acetoacetylo-CoA, fosfo-transacetylazę i kinazę octanową, i ostatecznie przekształcany jest do trzech cząsteczek acetylo-CoA lub octanu (rys. 3) [9, 27].

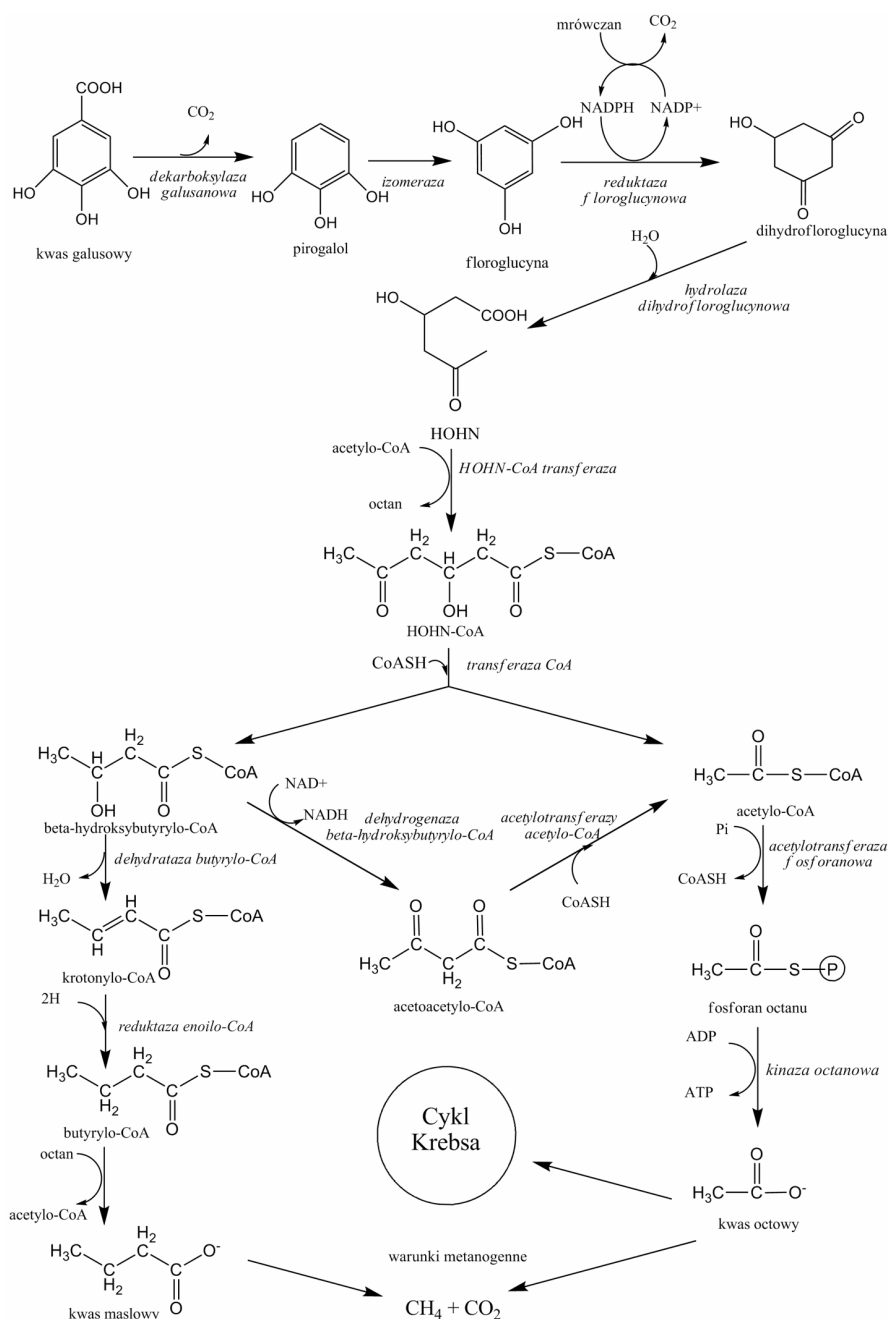
Proces utlenienia HOHN może przypominać β -oksydację. Z udziałem transferazy CoA dochodzi wtedy do przeniesienia grupy dwuwęglowej, pochodzącej z otrzymanego w poprzedniej reakcji HOHN-CoA, na cząsteczkę CoA, w efekcie czego powstają cząsteczki β -hydroksybutyrylo-CoA i acetylo-CoA [14, 26]. W wyniku utlenienia hydroksybutyrylo-CoA powstaje acetoacetylo-CoA. Otrzymany acetoacetylo-CoA, w reakcji katalizowanej przez acetylotransferazę acetylo-CoA, ulega tiolitycznemu rozszczepieniu na dwie cząsteczki acetylo-CoA. Związek ten metabolizowany jest do octanu. Ponadto β -hydroksybutyrylo-CoA stanowi także substrat dla dehydratazy butyrylo-CoA, odłączającej od niego cząsteczkę wody. Powstały krotonylo-CoA konwertowany jest przez reduktazę enoilo-CoA do butyrylo-CoA, a następnie przekształcany do kwasu masłowego (rys. 4).

Powstała z pirogalolu lub floroglucyny rezorcyna może podlegać rozkładowi różnymi drogami (rys. 5). Szlak opisany u *Clostridium* sp. rozpoczyna się redukcją do 1,3-ketocykloheksanianu. Następnie związek ten hydrolizowany jest do 5-keto-6-metyloheksanianu. Dalsze przemiany sześciowęglowego ketokwasu nie zostały do końca poznane, ale wydaje się prawdopodobne, że zachodzą one w sposób podobny do β -oksydacyjnego szlaku rozpadu floroglucyny. Produktami końcowymi tego szlaku są cząsteczki acetylo-CoA oraz kwas masłowy, konieczny do zachowania równowagi redoks. Rezorcyna może również ulegać hydrolizie do kwasu 5-keto-2-heksenowego. W wyniku β -oksydacji tego kwasu powstają trzy cząsteczki acetylo-CoA [9, 14].

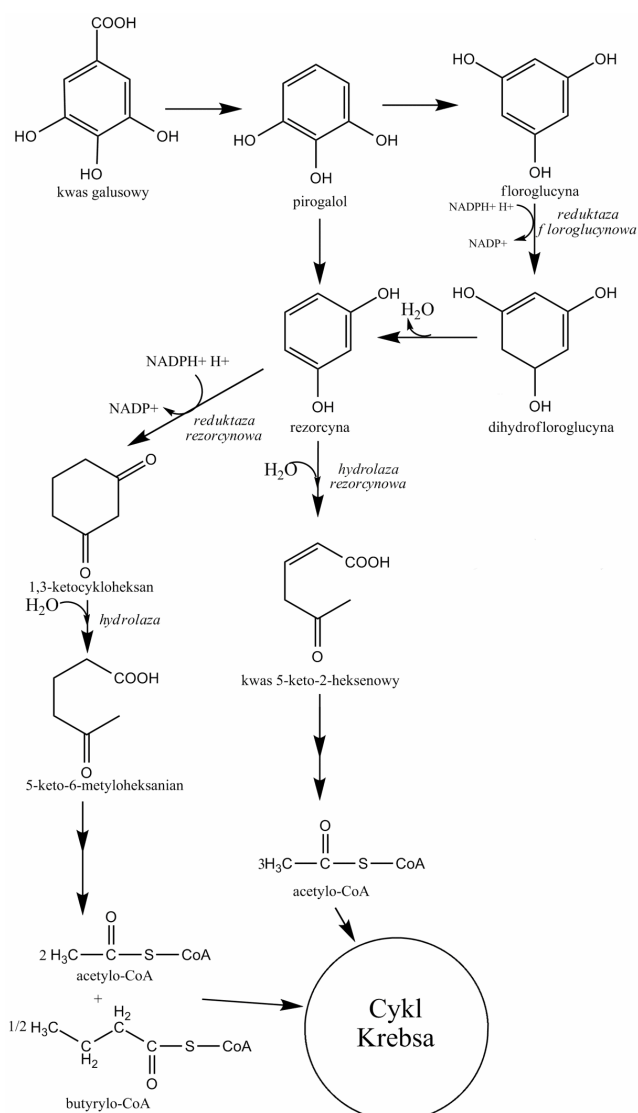
Produkty degradacji kwasu galusowego: octan i kwas masłowy w warunkach metanogenezy mogą ulegać transformacji do metanu i dwutlenku węgla [9, 30].

Podsumowując, różnorodność warunków i możliwych dróg rozkładu kwasu galusowego oraz związana z tym duża grupa indukowanych enzymów działających w różnych warunkach może być przyczynkiem do zastosowania układów kometa-bolicznych z GA, jako substratem wzrostowym, w procesach oczyszczania środowisk zdegradowanych. Przykładem związku, którego szlak rozkładu zajął się z drogami rozkładu GA, jest trudno degradowalny fenantren, należący do policyklicznych związków aromatycznych, wykazujący działanie rakotwórcze i teratogenne. Związek ten ulega rozkładowi z udziałem 3,4-dioksygenazy protokatechowej, która może zostać wyindukowana w obecności kwasu galusowego [31]. Innym przykładem jest rozkład powszechnie stosowanej w syntezie barwników sulfoaniliny, w której rozkład zaangażowana jest również 3,4-dioksygenaza protokatechowa [32]. W obecności kwasu galusowego może nastąpić również wzrost syntezy

4,5-dioxygenazy protokatechowej zaangażowanej w rozkład tereftalanu stosowanego w syntezie PET (polietylenotereftalan) czy szeroko stosowanych w przemyśle, a odznaczających się wysoką toksycznością dla organizmów, związków nitrowych [33, 34].



Rys. 4. Beztlenowy rozkład kwasu galusowego przez szczep *Eubacterium oxidoreducens* [26]



Rys. 5. Beztlenowa degradacja kwasu galusowego z rezorcyną jako kluczowym produktem przejściowym [9, 14, 28]

Powszechność występowania naturalnych źródeł kwasu galusowego w przyrodzie spowodowała wykształcenie w drodze ewolucji szeregu mechanizmów jego rozkładu przez mikroorganizmy. Jest to szczególnie ważne, gdyż roczne zapotrzebowanie na kwas galusowy różnych gałęzi przemysłu wynosi 8000 ton [4]. Związek ten, jako prekursor powszechnie stosowanych związków biologicznie czynnych, zarówno w celach leczniczych, jak też kosmetycznych i technicznych, nie przyczynia się znacząco do degradacji środowiska naturalnego, gdyż jest on metabolizowany przez znajdujące się w nim mikroorganizmy i stanowi alternatywę dla wzrastającej chemizacji środowiska.

Literatura

- [1] Sikorski Z.E., Chemia żywności, WNT, Warszawa 2002.
- [2] Budryn G., Nebesny E., Fenolokwasy - ich właściwości, występowanie w surowcach roślinnych, wchłanianie i przemiany metaboliczne, Bromat. Chem. Toksykol. 2006, XXXIX (2), 103-110.
- [3] Pleszczyńska M., Szczodrak J., Taniny i ich rozkład enzymatyczny, Biotechnologia 2005, 1(68), 152-165.
- [4] Bajpai B., Patil S., A new approach to microbial production of gallic acid, Brazilian J. Microbiol. 2008, 39, 708-711.
- [5] Kouroutzidou E., Georgaki I., Mantzavinos D., Manios T., Anaerobic biodegradability of gallic acid found in olive mill wastewaters, J. Chem. Technol. Biotechnol. 2006, 81, 1594-1599.
- [6] Nalewajko-Sieliwoniuk E., Wykorzystanie zjawiska chemiluminescencji do oznaczania polifenoli w układach przepływowych, Praca doktorska, Uniwersytet w Białymstoku 2009.
- [7] http://koszatniczka.org/cms_view_article.php (11.01.2010).
- [8] Greń I., Wojcieszynska D., Guzik U., Perkosz M., Hupert-Kocurek K., Enhanced biotransformation of mononitrophenols by *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 in the presence of aromatic compounds of plant origin, World J. Microbiol. Biotechnol. 2009, 26, 289-295.
- [9] Bhat T.K., Singh B., Sharma O.P., Microbial degradation of tannins - a current perspective, Biodegradation 1998, 9, 343-357.
- [10] Greń I., Guzik U., Wojcieszynska D., Łabużek S., Molekularne podstawy rozkładu ksenobiotycznych związków aromatycznych, Biotechnologia 2008, 81, 58-67.
- [11] Guzik U., Greń I., Wojcieszynska D., Łabużek S., Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation, Braz. J. Microbiol. 2009, 40, 284-290.
- [12] Singh B., Bhat T.K., Sharma O.P., Biodegradation of tannic acid in an in vitro ruminal system, Livest. Prod. Sci. 2001, 68, 259-262.
- [13] Zeida M., Wieser M., Yoshida T., Sugio T., Nagasawa T., Purification and characterization of gallic acid decarboxylase from *Pantoea agglomerans* T71, Environ. Microbiol. 1998, 64(12), 4743-4747.
- [14] Heider J., Fuchs G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds, Eur. J. Biochem. 1997, 243, 577-596.
- [15] Mendonça E., Martins A., Anselmo A.M., Biodegradation of natural phenolic compounds as single and mixed substrates by *Fusarium flocciferum*, Electron. J. Biotechnol. 2004, 7, 30-37.
- [16] O'Donovan L., Brooker J.D., Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*, Microbiology 2001, 147, 1025-1033.
- [17] Dagley S., Microbial catabolism, the carbon cycle and environmental pollution, Naturwissenschaften 1978, 65, 85-95.
- [18] Sparnins V.L., Dagley S., Alternative routes of aromatic catabolism in *Pseudomonas acidorans* and *Pseudomonas putida*: gallic acid as a substrate and inhibitor of dioxygenases, J. Bacteriol. 1975, 124(3), 1374-1381.
- [19] Müller N., Hempel M., Philipp B., Gross E.M., Degradation of gallic acid and hydrolysable polyphenols is constitutively activated in the freshwater plant-associated bacterium *Matsueibacter* sp. FB25, Aquat. Microb. Ecol. 2007, 47, 83-90.
- [20] Tack B.F., Chapman P.J., Dagley S., Metabolism of gallic acid and syringic acid by *Pseudomonas putida*, J. Biol. Chem. 1972, 247(20), 6438-9443.
- [21] Kersten P.J., Dagley S., Whittaker J.M., Arciero D.M., Lipscomb J., 2-Pyrone-4,6-dicarboxylic acid, a catabolite of gallic acids in *Pseudomonas* species, J. Bacteriol. 1982, 152(3), 1154-1162.
- [22] Dewick M., Haslam E., Phenol biosynthesis in higher plants. Gallic acid, Biochem. J. 1969, 113, 537-542.
- [23] Johnson B.F., Stanier R.J., Regulation of the β -Ketoacid pathway in *Alcaligenes eutrophus*, J. Bacteriol. 1971, 107(2), 476-485.
- [24] Berry F.B., Francis A.J., Bollag J.M., Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions, Microbiol. Rev. 1987, 51(1), 43-59.

- [25] Alberto M.R., Gomez-Cordove C., Manca De Nadra M.C., Metabolism of gallic acid and catechin by *Lactobacillus hilgardii* from wine, *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 6465-6469.
- [26] Krumholz L.R., Crawford R.L., Hemling M.E., Bryant M. P., Metabolism of gallate and phloroglucinol in *Eubacterium oxidoreducens* via 3-hydroxy-5-oxohexanoate, *J. Bacteriol.* 1987, 169(5), 1886-1890.
- [27] Schink B., Pfennig N., Fermentation of trihydroxybenzenes by *Pelobacter acidigallici* gen. nov. sp. nov., a new strictly anaerobic, non-sporeforming bacterium, *Arch. Microbiol.* 1982, 133, 195-201.
- [28] Murdiati T.B., Mcsweeney C.S., Lowry J.B., Metabolism in sheep of gallic acid, tannic acid and hydrolysable tannin from *Temninalia oblongata*, *Aust. J. Agric. Res.* 1992, 43, 1307-19.
- [29] Patel T.R., Jure K.G., Jones G.A., Catabolism of phloroglucinol by the rumen anaerobe *Coprococcus*, *Environ. Microbiol.* 1981, 42(6), 1010-1017.
- [30] Sleat R., Robinso J.P., The bacteriology of anaerobic degradation of aromatic compounds, *J. Appl. Bacteriol.* 1984, 57, 381-394.
- [31] Barnsley E.A., Phthalate pathway of phenanthrene metabolism: formation of 2'-carboxy-benzalpyruvate, *J. Bacteriol.* 1983, 154, 113-117.
- [32] Contzen M., Stolz A., Characterization of the genes for two protocatechuate 3,4-dioxygenase from the 4-sulfocatechol-degrading bacterium *Agrobacterium radiobacter* strain S2, *J. Bacteriol.* 2000, 182, 6123-6129.
- [33] Ye. J., Singh A., Ward O.P., Biodegradation of nitroaromatics and other nitrogen-containing xenobiotics, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 20, 117-135.
- [34] Sasoh M., Masai E., Ishibashi S., Hara H., Kamimura N., Miyauchi K., Fukuda M., Characterization of the terephthalate degradation genes of *Comamonas* sp. strain E6, *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 1825-1832.

Microbiological Degradation of Gallic Acid

Gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) is widely distributed throughout the plant kingdom. It is present in almost all plants. High gallic acid contents can be found in gallnuts, grapes, tea, hops and oak bark. According to its biochemical properties gallic acid is an industrially important chemical used as an antioxidant in food, cosmetics and pharmaceutical industries. It possesses a lot of potential therapeutic properties including anti-cancer and antimicrobial ones. The gallic acid is readily utilized by oxidative breakdown to simple aliphatic acids that are metabolized through the citric acid cycle. Although different aerobic pathways for the aromatic acids biodegradation are known they usually involve the formation of protocatechuate as a common intermediate. Protocatechuate may be cleaved by protocatechuate 3,4-dioxygenase [EC 1.13.11.3], which catalyzes the intradiol addition of molecular oxygen and forms 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid as well as protocatechuate 4,5-dioxygenase [1.13.11.8] that catalyzes extradiol addition of molecular oxygen result in 4-carboxy-2-hydroxy-*cis,cis*-muconic semialdehyde formation. Another mechanism of gallic acid degradation is observed in fungi. In *Aspergillus niger* gallic acid is oxidatively cleaved by an oxygenase to unstable tricarboxylic intermediate decarboxylated by an oxidative decarboxylase to *cis*-aconitic acid enter the citric acid cycle. *Aspergillus flavus* degrades gallic acid to oxaloacetic acid and finally pyruvic acid through the tricarboxylic acid intermediates. Different mechanisms of anaerobic breakdown of gallic acid are known. At the first step of its degradation gallate is decarboxylated to 1,2,3-trihydroxybenzene, which is isomerized to phloroglucinol by pyrogallol-phloroglucinol isomerase and then reduced to dihydrophloroglucinol by phloroglucinol reductase. In the next step dihydrophloroglucinol is converted to 3-hydroxy-5-oxohexanoic acid (HOHN) by dihydrophloroglucinol hydrolase. Then, HOHN may be degraded through different pathways. The first one is its conversion to 3,5-dioxohexanoate (triacetate) by HOHN dehydrogenase and ultimately to three molecules of acetyl-CoA via triacetyl-CoA by the sequential enzymatic reactions catalyzed by triacetyl-CoA transferase, triacetate -ketothiolase, acetoacetyl-CoA-ketothiolase, phosphotriacetylase and acetate kinase. In methanogenic conditions HONH-CoA is transformed to butyrate or acetate, which are finally degraded to methane and carbon dioxide.

Keywords: gallic acid, bacteria, degradation