

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **233829**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **420801**

(51) Int.Cl.  
**C11C 3/00 (2006.01)**  
**C12P 7/62 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **10.03.2017**

(54) **Zastosowanie polisacharydów pochodzenia bakteryjnego wraz z lipazą wyizolowaną z *Rhizomucor variabilis* w reakcjach estryfikacji wyższych kwasów tłuszczowych oraz sposób otrzymywania takich estrów**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**24.09.2018 BUP 20/18**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**29.11.2019 WUP 11/19**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet  
MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ, Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**RENATA BANCERZ, Dąbrowica, PL  
MONIKA OSIŃSKA-JAROSZUK, Lublin, PL  
MAGDALENA JASZEK, Piotrawin, PL  
MONIKA JANCZAREK, Lublin, PL  
JERZY ROGALSKI, Lublin, PL**

**PL 233829 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowe zastosowanie polisacharydów produkowanych przez szczepy bakterii *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkani* czy też *Sinorhizobium meliloti* wraz z katalizatorem enzymatycznym w postaci lipazy wyizolowanej z *Rhizomucor variabilis*, w reakcjach estryfikacji wyższych kwasów tłuszczowych, takich jak, oleinowy lub kaprylowy z alkoholem o hydrofobowym łańcuchu alkilowym, takim jak butanol oraz sposób otrzymywania takich estrów.

Procesy enzymatycznej syntezy estrów wyższych kwasów tłuszczowych z alkoholami o hydrofobowych łańcuchach alkilowych, znane są od dawna i opisane w dostępnej literaturze.

W czasopismach jak np. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 2006, t. 39(1–4), s. 83–90 opisany jest sposób otrzymywania oleinianu butylu katalizowany przez lipazę z *Candida antarctica* B; w czasopiśmie *Catalysis Letters*, 2009, t. 129, s. 312–322 opisano sposób otrzymywania oleinianu butylu, w którym reakcja estryfikacji zachodzi w obecności lipazy produkowanej przez *Candida rugosa*, zaś w czasopiśmie *Enzyme Microbiology and Technology*, 2004, t. 35(4), s. 355–363 opisano sposób syntezy oleinianu butylu, katalizowany przez lipazę z *Rhizopus oryzae*, immobilizowaną na węglanie wapnia. Z kolei w czasopismach *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004, t. 113–116, s. 189–199 i *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2007, t. 34, s. 553–560, opisano sposoby otrzymywania estrów wyższych kwasów tłuszczowych i alkoholi o różnych długościach łańcucha węglowego katalizowane przez lipazę rozpuszczalną immobilizowaną z *Bjerkandera adusta* R59.

Z opisów patentowych PL 165256 i PL 165259 znane są sposoby syntezy estrów kwasu oleinowego i alkoholu butylowego, w którym reakcję prowadzi się w środowisku eteru naftowego, w temperaturze 30°C i w czasie 24 godzin, z udziałem katalizatorów w postaci lipaz otrzymywanych z *Mucor racemosus* A37, czy też *Mucor javanicus* T45. Z czasopisma *Acta Biochimica Polonica*, 2014, t. 61(S1), P15.2, s. 273 i *Materiałów 54 Zjazdu Naukowego PTChem.*, 2011, P65, s. 358 znane są sposoby syntezy estrów kwasu kaprylowego oleinowego oraz alkoholu butylowego, w których reakcje prowadzi się w heksanie, w czasie 72 godzin, udziałem lipazy otrzymanej z *Rhizomucor variabilis*, znaną z publikacji *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2016, t. 63, s. 67–76.

W wymienionych przykładowych procesach, wydajność estryfikacji jest w dużym stopniu uzależniona od rodzaju środowiska w którym przebiega reakcja, stężenia substratów i ich stosunków stechiometrycznych, doboru i sposobu unieruchomienia enzymu oraz jego ilości jednostek enzymatycznych.

Celem wynalazku było więc prowadzenie badań nad opracowaniem katalizatora enzymatycznego do zastosowania w reakcjach estryfikacji wyższych kwasów tłuszczowych z alkoholami o hydrofobowych łańcuchach alkilowych, przebiegających z możliwie dużą wydajnością, w stosunkowo krótkim czasie i stabilnych warunkach.

Badania ukierunkowano na możliwość wykorzystania polisacharydów produkowanych przez szczepy bakterii *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkani* i *Sinorhizobium meliloti*.

Z czasopisma *Trends in Biotechnology*, 2011, t. 29, s. 388–398 znane jest zastosowanie zewnątrzkomórkowych heteropolisacharydów syntetyzowanych przez bakterie symbiotyczne (rizobia) w medycynie jako składniki czynników immunostymulujących, w przemyśle spożywczym jako zagęstniki, w ochronie środowiska do usuwania zanieczyszczeń metalami ciężkimi i olejami.

W patencie US 6344346 opisano zastosowanie rizobiowych heteropolisacharydów w przemyśle kosmetycznym jako składniki kremów nawilżających, toników, żeli kąpielowych, żeli do włosów.

Z patentu CN 102816724 znane jest zastosowanie z *Rhizobium radiobacter* S10 jako zagęstnika w przemyśle spożywczym oraz w medycynie dzięki jego dobrej stabilności i właściwościom emulgacyjnym.

W patencie US 2010078590 opisano polisacharyd produkowany przez *Rhizobium tropici* ATCC49672, który używa się do produkcji suchej soli, a jego dodatek do gleby uprawnej w stężeniu 0,1% zapobiegał jej erozji.

Patent CN 101744757 opisuje z kolei możliwość zastosowania gumy rizobiowej jako dodatek do kosmetyków o właściwościach nawilżających i wygładzających.

Jak wynika z wyżej wymienionych publikacji nigdzie nie ujawniono zastosowania żadnego z wyżej wymienionych polisacharydów w procesie estryfikacji kwasów tłuszczowych katalizowanym przez lipazę.

Nieoczekiwanie okazało się, że pozytywne efekty w reakcjach estryfikacji wyższych kwasów tłuszczowych z alkoholami o hydrofobowych łańcuchach alkilowych, dało nowe zastosowanie jako enzymu katalizującego, lipazy, znanej z publikacji *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2016, t. 63,

s. 67–76 i wyizolowanej z *Rhizomucor variabilis*, wraz z polisacharydami wyizolowanymi ze szczepów bakterii *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkani* czy też *Sinorhizobium meliloti*.

Istotą wynalazku jest nowe zastosowanie polisacharydów pochodzenia bakteryjnego wyizolowanych ze szczepów bakterii *Bradyrhizobium japonicum* lub *Bradyrhizobium elkani*, lub *Sinorhizobium meliloti* wraz z katalizatorem enzymatycznym w postaci lipazy wyizolowanej z *Rhizomucor variabilis* w reakcjach estryfikacji wyższych kwasów tłuszczowych, takich jak, oleinowy lub kaprylowy z alkoholem o hydrofobowym łańcuchu alkilowym, takim jak, butanol.

Istotą wynalazku jest również sposób otrzymywania estrów wyższych kwasów tłuszczowych, takich jak, oleinowy i kaprylowy z alkoholem o hydrofobowym łańcuchu alkilowym, takim jak butanol, z udziałem katalizatora enzymatycznego w postaci lipazy wyizolowanej z *Rhizomucor variabilis*, polegający na sporządzeniu roztworu alkoholu z kwasem w wysoce niepolarnym rozpuszczalniku organicznym charakteryzujący się tym, że stosunki objętościowe alkoholu i jednego z wymienionych kwasów w całej mieszaninie reakcyjnej zawierają się w granicach od 1 : 5 do 5 : 1, ich stężenia molowe są jednakowe i mieszczą się w zakresie od 0,05M do 0,5M, a ilość lipazy dodawanej do tak sporządzonego roztworu odpowiada zawartości od 40 do 50 jednostek enzymatycznych (U) w przeliczeniu na 1 ml rozpuszczalnika, takiego jak, cykloheksan lub heksan czy heptan, zaś ilość polisacharydu bakteryjnego wyizolowanego ze szczepów bakterii *Bradyrhizobium japonicum* lub *Bradyrhizobium elkani*, lub *Sinorhizobium meliloti* wynosi od 0,005 do 0,02% w stosunku do objętości użytego rozpuszczalnika, przy czym reakcję prowadzi się w znanych warunkach temperatury.

Wynalazek przedstawiono w poniższych przykładach wykonania, gdzie tabela 1 uwidacznia korzystny zakres ilościowy lipazy w stosunku do pozostałych reagentów, a przykłady 1 i 2 prezentują estryfikacje tylko z udziałem lipazy z *Rhizomucor variabilis*, zaś przykłady od 3 do 8 reakcje otrzymywania oleinianu i kaprylanu butylu według wynalazku z dodatkiem polisacharydów bakteryjnych.

Tabela 1

| Ilość jednostek aktywności lipazy [U] | Wydajność estryfikacji oleinianu butylu po 12 godz (%) |                               |
|---------------------------------------|--|-------------------------------|
|                                       | Kontrola (bez EPS)                                     | EPS z <i>G. aplanatum</i> 261 |
| 20                                    | 18,6   | 32,8                          |
| 30                                    | 28,5   | 50,3                          |
| 40                                    | 42,7   | 76,5                          |
| 50                                    | 46,3   | 82,5                          |
| 60                                    | 44,8   | 78,4                          |

#### Przykład 1

W kolbce stożkowej zaopatrzonej w szczelne zamknięcie umieszczono 86  $\mu$ l butanolu, 316  $\mu$ l kwasu oleinowego oraz 5  $\mu$ l wody MiliQ, 10 mg liofilizatu lipazy z *Rhizomucor variabilis*, co odpowiada aktywności enzymatycznej 500 U i 10 ml heksanu. Kolbkę szczelnie zamknięto i prowadzono reakcję w temperaturze 40°C, w czasie 12 godzin, mieszając próbę z szybkością 140 obrotów/minutę. Otrzymano oleinian butylu, dla którego procentowa wydajność syntezy, określona na podstawie ilości KOH zużytego na zmiareczkowanie pozostałych w mieszaninie reakcyjnej kwasów tłuszczowych, nie zużytych przez lipazę do zestryfikowania alkoholi wynosiła 46,3%.

#### Przykład 2

W kolbce stożkowej zaopatrzonej w szczelne zamknięcie umieszczono 86  $\mu$ l kwasu butanolu, 158,5  $\mu$ l kwasu kaprylowego oraz 5  $\mu$ l wody MiliQ, 10 mg liofilizatu lipazy z *Rhizomucor variabilis*, co odpowiada aktywności enzymatycznej 500 U i 10 ml heksanu. Kolbkę szczelnie zamknięto i prowadzono reakcję w temperaturze 40°C, w czasie 12 godzin, mieszając próbę z szybkością 140 obrotów/minutę. Otrzymano kaprylan butylu, dla którego wydajność syntezy wynosiła 42%.

#### Przykład 3

W kolbce stożkowej jak w przykładzie 1 umieszczono 43  $\mu$ l butanolu, 158  $\mu$ l kwasu oleinowego, 5  $\mu$ l wody MiliQ, 0,5 mg polisacharydu z bakterii *Bradyrhizobium elkani*, 8 mg liofilizatu lipazy z *Rhizomucor variabilis*, co odpowiada aktywności enzymatycznej 400 U oraz 10 ml cykloheksanu. Kolbkę

szczelnie zamknięto i prowadzono reakcję w temperaturze 40°C, w czasie 8 godzin, mieszając próbę z szybkością 140 obrotów/minutę. Otrzymano oleinian butylu, dla którego wydajność syntezy wynosiła 73,5%.

#### Przykład 4

W kolbce stożkowej jak w przykładzie 1 umieszczono 43 µl butanolu, 79,25 µl kwasu kaprylowego, 5 µl wody MiliQ, 0,5 mg polisacharydu z bakterii *Bradyrhizobium elkani* 10 mg liofilizatu lipazy z *Rhizomucor variabilis*, co odpowiada aktywności enzymatycznej 500 U oraz 10 ml heksanu. Kolbkę szczelnie zamknięto i prowadzono reakcję w temperaturze 40°C, w czasie 9 godzin, mieszając próbę z szybkością 140 obrotów/minutę. Otrzymano kaprylan butylu, dla którego wydajność syntezy wynosiła 78,3%.

#### Przykład 5

W kolbce stożkowej zaopatrzonej w szczelne zamknięcie umieszczono 0,43 ml butanolu, 1,58 kwasu oleinowego, 5 µl wody MiliQ, 2 mg polisacharydu z bakterii *Sinorhizobium meliloti*, 10 mg liofilizatu lipazy z *Rhizomucor variabilis*, co odpowiada aktywności enzymatycznej 500 U oraz 10 ml heksanu. Kolbkę szczelnie zamknięto i prowadzono reakcję w temperaturze 40°C w czasie 10 godzin mieszając próbę z szybkością 140 obrotów/minutę. Otrzymano oleinian butylu, dla którego wydajność syntezy wynosiła 71,5%.

#### Przykład 6

W kolbce stożkowej zaopatrzonej w szczelne zamknięcie umieszczono 0,43 ml butanolu, 0,792 µl kwasu kaprylowego, 5 µl wody MiliQ, 2 mg polisacharydu z bakterii *Sinorhizobium meliloti*, 10 mg liofilizatu lipazy z *Rhizomucor variabilis*, co odpowiada aktywności enzymatycznej 500 U oraz 10 ml heptanu. Kolbkę szczelnie zamknięto i prowadzono reakcję w temperaturze 40°C, w czasie 6 godzin, mieszając próbę z szybkością 140 obrotów/minutę. Otrzymano kaprylan butylu, dla którego wydajność syntezy wynosiła 77%.

#### Przykład 7

W kolbce stożkowej zaopatrzonej w szczelne zamknięcie umieszczono 86 µl butanolu, 0,632 µl kwasu oleinowego, 5 µl wody MiliQ, 1 mg polisacharydu z *Bradyrhizobium japonicum*, 8 mg liofilizatu lipazy z *Rhizomucor variabilis*, co odpowiada aktywności enzymatycznej 400 U oraz 10 ml heksanu. Kolbkę szczelnie zamknięto i prowadzono reakcję w temperaturze 40°C, w czasie 10 godzin, mieszając próbę z szybkością 140 obrotów/minutę. Otrzymano oleinian butylu, dla którego wydajność syntezy wynosiła 71,5%.

#### Przykład 8

W kolbce stożkowej zaopatrzonej w szczelne zamknięcie umieszczono 86 µl butanolu, 0,634 µl kwasu kaprylowego, 5 µl wody MiliQ, 1 mg polisacharydu z *Bradyrhizobium japonicum*, 10 mg liofilizatu lipazy z *Rhizomucor variabilis*, co odpowiada aktywności enzymatycznej 500 U oraz 10 ml heksanu. Kolbkę szczelnie zamknięto i prowadzono reakcję w temperaturze 40°C, w czasie 9 godzin, mieszając próbę z szybkością 140 obrotów/minutę. Otrzymano kaprylan butylu, dla którego wydajność syntezy wynosiła 84%.

Wydajności syntez oleinianu butylu z udziałem polisacharydów bakteryjnych, według wynalazku na tle wydajności reakcji estryfikacji bez udziału polisacharydów z przykładów 1 i 2, przedstawiono na rysunku jako fig. 1, zaś wydajności syntez kaprylanu butylu jako fig. 2.

## **Zastrzeżenia patentowe**

1. Zastosowanie polisacharydów pochodzenia bakteryjnego wyizolowanych ze szczepów bakterii *Bradyrhizobium japonicum* lub *Bradyrhizobium elkani*, lub *Sinorhizobium meliloti* wraz z katalizatorem enzymatycznym w postaci lipazy wyizolowanej z *Rhizomucor variabilis*, w reakcjach estryfikacji wyższych kwasów tłuszczowych, takich jak, oleinowy lub kaprylowy z alkoholem o hydrofobowym łańcuchu alkilowym, takim jak, butanol.
2. Sposób otrzymywania estrów wyższych kwasów tłuszczowych, takich jak, oleinowy i kaprylowy z alkoholem o hydrofobowym łańcuchu alkilowym, takim jak butanol, z udziałem katalizatora enzymatycznego w postaci lipazy wyizolowanej z *Rhizomucor variabilis*, polegający na sporządzeniu roztworu alkoholu z kwasem w wysoce niepolarnym rozpuszczalniku organicznym **znamienny tym**, że stosunki objętościowe alkoholu i jednego z wymienionych kwasów w całej mieszaninie reakcyjnej zawierają się w granicach od 1:5 do 5:1, ich stężenia molowe

są jednakowe i mieszczą się w zakresie od 0.05M do 0.5M, a ilość lipazy dodawanej do tak sporządzonego roztworu odpowiada zawartości od 40 do 50 jednostek enzymatycznych (U) w przeliczeniu na 1 ml rozpuszczalnika, takiego jak, cykloheksan lub heksan czy heptan, zaś ilość polisacharydu bakteryjnego wyizolowanego ze szczepów bakterii *Bradyrhizobium japonicum* lub *Bradyrhizobium elkan*, lub *Sinorhizobium meliloti* wynosi od 0.005 do 0.02% w stosunku do objętości użytego rozpuszczalnika.

## Rysunki

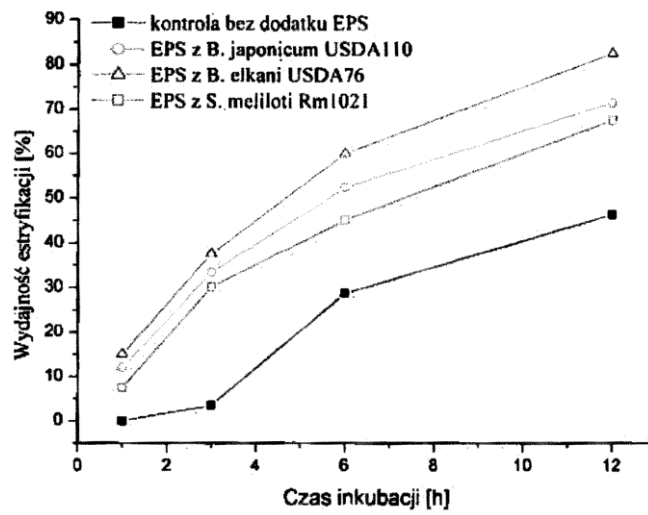


fig. 1

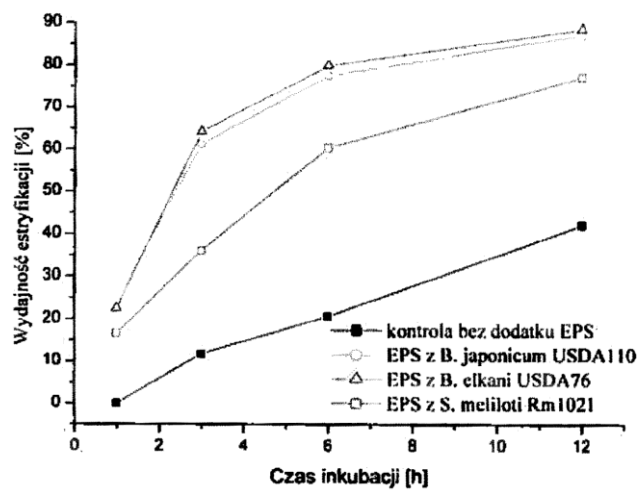


fig. 2

