

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **233924**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **420800**

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

(22) Data zgłoszenia: **10.03.2017**

---

(54) **Zastosowanie polisacharydów pochodzenia grzybowego 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:  
**31.12.2019 WUP 12/19**

(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  
ADRIAN WIATER, Lublin, PL  
JERZY ROGALSKI, Lublin, PL**

---

**PL 233924 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowe zastosowanie polisacharydów grzybowych wyizolowanych z grzybów *Abortiporus biennis*, *Ganoderma applanatum* czy też *Piptoporus betulinus* i *Laetiporus sulphureus* wraz z katalizatorem enzymatycznym w postaci lipazy wyizolowanej z *Rhizomucor variabilis*, w reakcjach estryfikacji wyższych kwasów tłuszczowych z alkoholami o hydrofobowych łańcuchach alkilowych oraz sposób otrzymywania takich estrów, na przykładzie oleinianu i kaprylanu butylu.

Procesy enzymatycznej syntezy estrów wyższych kwasów tłuszczowych z alkoholami o hydrofobowych łańcuchach alkilowych, znane są 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* A3 7 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 i 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 grzyby *Abortiporus biennis* i *Ganoderma applanatum* oraz *Piptoporus betulinus* i *Laetiporus sulphureus*.

Jak opisano w publikacji *Food Research International*, 2010, t. 43, s. 2262–2269 preparaty otrzymane z *Ganoderma* mają zastosowanie przy produkcji piwa.

W publikacji *BioMed Research International*, 2014, art. no. 743812, doi: 10.1155/2014/743812 opisano możliwość wykorzystania egzopolisacharydów izolowanych ze szczepu *Ganoderma applanatum* jako substancji bioaktywnej o właściwościach cytotoksycznych i antybakteryjnych. W czasopiśmie *Biotechnologia*, 2008, t. 80(1), s. 109–121 opisano egzobiopolimery uzyskane ze szczepu *Hericium erinaceum* do zastosowania w medycynie, do obniżania poziomu cholesterolu i zawartości lipidów we krwi, natomiast w czasopiśmie *Journal of Food Composition and Analysis*, 2012, t. 26(1–2), 144–153 opisano egzopolisacharydy pochodzące ze szczepów *Ganoderma applanatum* i *Ganoderma lucidum* do zastosowania w medycynie dzięki ich właściwościom antyoksydacyjnym, przeciwnowotworowym i immunostymulującym. Z publikacji *Biochemistry-Moscow* znane jest wykorzystanie grzyba *Abortiporus biennis* do produkcji oksydazy fenolowej (lakazy) oraz inhibitorów trypsyny.

Dotychczas nie znane jest zastosowanie polisacharydów pozyskiwanych ze szczepów *Abortiporus biennis* i *Ganoderma applanatum* w reakcjach estryfikacji. Z publikacji *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, t. 18 (7), s. 1335–1341 i *Biotechnologia*, 2008, t. 81(2), 174–189 znane jest wykorzystanie polisacharydu – glukanu grzybowego, otrzymywanego z owocników porka brzoźowego (*Piptoporus betulinus*) i żółciaka siarkowego (*Laetiporus sulphureus*) jako źródła mutanazy, enzymu działającego specyficznie na polimery spajające płytkę nazębną. W publikacji „Żywność. Nauka. Technologia.

Jakość”, 2007, t. 6(55), s. 170–176 wykazano możliwość zastosowania w medycynie, rozpuszczalnej w wodzie niskocząsteczkowej frakcji  $\alpha$ -glukanów wyizolowanej z owocników *Pleurotus ostreatus* dzięki właściwościom antyproliferacyjnym i proapoptotycznym w stosunku do linii komórek nowotworowych uzyskanych z ludzkiego raka jelita grubego, natomiast z czasopism *International Journal of Biological Macromolecules*, 2004, t. 34(5), s. 231–236 oraz *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, t. 51(5), s. 1014–1023 znane jest wykorzystanie EPS izolowanych z *Poria cocos* i *Ganoderma lucidum* w medycynie, dzięki ich aktywności przeciwnowotworowej i immunomodulacyjnej. W czasopiśmie *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2006, t. 70(12), s. 2883–2888 opisano zastosowanie  $\alpha$ -(1→3)-glukanu wyizolowanego z *Penicillium chrysogenum* jako matrycy do immobilizacji lipazy z *Candida sp.*

Jak wynika z wyżej wymienionych publikacji dotychczas 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 zewnątrzkomórkowych polisacharydów wyizolowanych z grzybów *Abortiporus biennis* lub *Ganoderma applanatum* oraz polisacharydów wyizolowanych ze ściany komórkowej grzybów *Piptoporus betulinus* czy też *Laetiporus sulphureus*, wraz z enzymem katalizującym lipazą, wyizolowaną z *Rhizomucor variabilis*.

Istotą wynalazku jest nowe zastosowanie polisacharydów grzybowych wyizolowanych z grzybów *Abortiporus biennis* lub *Ganoderma applanatum* czy też *Piptoporus betulinus* lub *Laetiporus sulphureus* 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 lub 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 grzybowego wyizolowanego z grzybów *Abortiporus biennis* lub *Ganoderma applanatum*, lub *Piptoporus betulinus*, lub *Laetiporus sulphureus*, wynosi od 0,005 do 0,02% w stosunku do objętości użytego rozpuszczalnika.

Wynalazek przedstawiono w poniższych przykładach wykonania, gdzie tabela 1 uwidacznia korzystny zakres ilościowy lipazy w stosunku do pozostałych reagentów, przykłady 1 i 2 prezentują estryfikacje tylko z udziałem lipazy z *Rhizomucor variabilis*, zaś przykłady od 3 do 10 reakcje otrzymywania oleinianu i kaprylanu butylu według wynalazku.

Zaletą wynalazku, jak wynika z przykładów 1–10, jest większa wydajność i skrócenie czasu reakcji estryfikacji wyższych kwasów tłuszczowych z alkoholami o hydrofobowych łańcuchach alkilowych.

Tabela 1

Ilość jednostek aktywności lipazy [U]	Wydajność estyfikacji oleinianu butylu po 12 godz (%)	
	Kontrola (bez EPS)	EPS z <i>G. applanatum</i> 261
20	18,6	33,3
30	28,5	47,6
40	42,7	72,3
50	46,3	79,2
60	44,8	71,4

Przykład 1

W kolbce stożkowej zaopatrzonej w szczelne zamknięcie umieszczono 86 µl butanolu, 316 µl kwasu oleinowego oraz 5 µl 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 zestyfikowania alkoholi, po 12 godz. reakcji wynosiła 46,3%.

Przykład 2

W kolbce stożkowej zaopatrzonej w szczelne zamknięcie umieszczono 86 µl kwasu butanolu, 158,5 µl kwasu kaprylowego oraz 5 µl 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 po 12 godz. wynosiła 42%.

Przykład 3

W kolbce stożkowej jak w przykładzie 1 umieszczono 43 µl butanolu, 158 µl kwasu oleinowego, 5 µl wody MiliQ, 0,5 mg polisacharydu grzybowego z *Ganoderma applanatum*, 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 68,6 % .

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 grzybowego z *Ganoderma applanatum*, 8 mg liofilizatu lipazy z *Rhizomucor variabilis*, co odpowiada aktywności enzymatycznej 400U 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 71,6%.

Przykład 5

W kolbce stożkowej zaopatrzonej w szczelne zamknięcie umieszczono 0,43 ml butanolu, 1,58 ml kwasu oleinowego, 5 µl wody MiliQ, 2 mg polisacharydu grzybowego z *Abortiporus biennis*, 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 10 godzin mieszając próbę z szybkością 140 obrotów/minutę. Otrzymano oleinian butylu, dla którego wydajność syntezy wynosiła 58,4%.

Przykład 6

W kolbce stożkowej zaopatrzonej w szczelne zamknięcie umieszczono 0,43 ml butanolu, 0,792 ml kwasu kaprylowego, 5 µl wody MiliQ, 2 mg polisacharydu grzybowego z *Abortiporus biennis*, 10 mg liofilizatu lipazy z *Rhizomucor variabilis*, co odpowiada aktywności enzymatycznej 500 U oraz 10 ml

cykloheksanu. 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 61,2%.

#### Przykład 7

W kolbce stożkowej zaopatrzonej w szczelne zamknięcie umieszczono 86  $\mu$ l butanolu, 0,632 ml kwasu oleinowego, 5  $\mu$ l wody MiliQ, 1 mg polisacharydu z *Laetiporus sulphureus*, 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 76,4%.

#### Przykład 8

W kolbce stożkowej zaopatrzonej w szczelne zamknięcie umieszczono 86  $\mu$ l butanolu, 0,634 ml kwasu kaprylowego, 5  $\mu$ l wody MiliQ, 1 mg polisacharydu z *Laetiporus sulphureus*, 10 mg liofilizatu lipazy z *Rhizomucor variabilis*, co odpowiada aktywności enzymatycznej 500 U na 10 ml heptanu. 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 69,3%.

#### Przykład 9

W kolbce stożkowej zaopatrzonej w szczelne zamknięcie umieszczono 258  $\mu$ l butanolu, 316  $\mu$ l kwasu oleinowego, 5  $\mu$ l wody MiliQ, 0,5 mg polisacharydu z *Piptoporus betulinus*, 8 mg liofilizatu 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 8 godzin mieszając próbę z szybkością 140 obrotów/minutę. Otrzymano oleinian butylu, dla którego wydajność syntezy wynosiła 73,8%.

#### Przykład 10

W kolbce stożkowej zaopatrzonej w szczelne zamknięcie umieszczono 344  $\mu$ l butanolu, 317  $\mu$ l kwasu kaprylowego, 5  $\mu$ l wody MiliQ, 2 mg polisacharydu z *Piptoporus betulinus*, 10 mg liofilizatu lipazy z *Rhizomucor variabilis*, co odpowiada aktywności enzymatycznej 500 U oraz 10 ml cykloheksanu. Kolbkę szczelnie zamknięto i prowadzono reakcję w temperaturze 40°C w czasie 11 godzin mieszając próbę z szybkością 140 obrotów/minutę. Otrzymano kaprylan butylu, dla którego wydajność syntezy wynosiła 85,3%.

Wydajności syntez oleinianu butylu z udziałem polisacharydów grzybowych, 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 grzybowego wyizolowanych z grzybów *Abortiporus biennis* lub *Ganoderma applanatum*, lub *Piptoporus betulinus* czy też *Laetiporus sulphureus* 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 lub 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 wraz z jednym z wymienionych kwasów w wysoce niepolarnym rozpuszczalniku organicznym **znamienny tym**, że stosunki objętościowe alkoholu i kwasu, 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 grzybowego wyizolowanego z grzybów *Abortiporus biennis* lub *Ganoderma applanatum* lub *Piptoporus betulinus*, lub *Laetiporus sulphureus*, wynosi od 0,005 do 0,02% w stosunku do objętości użytego rozpuszczalnika.

## Rysunki

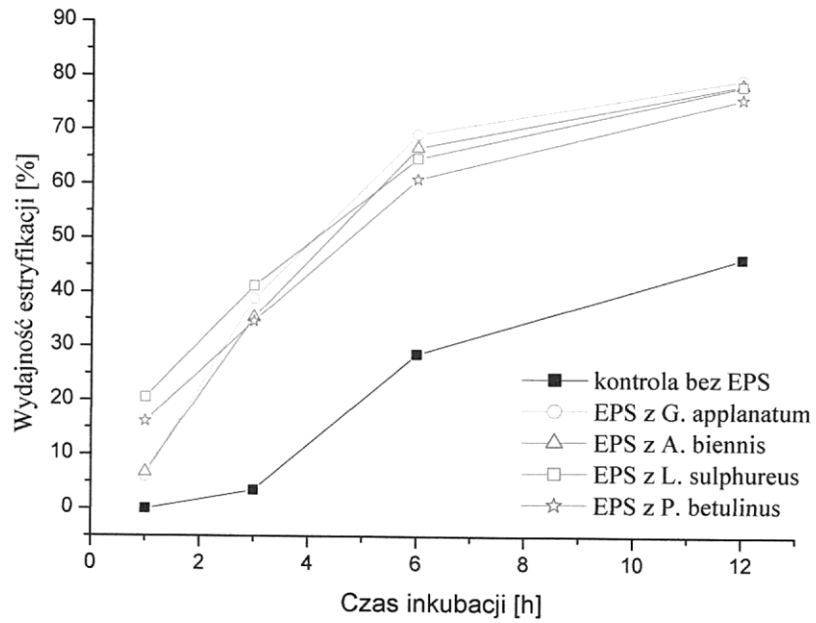


Fig.1

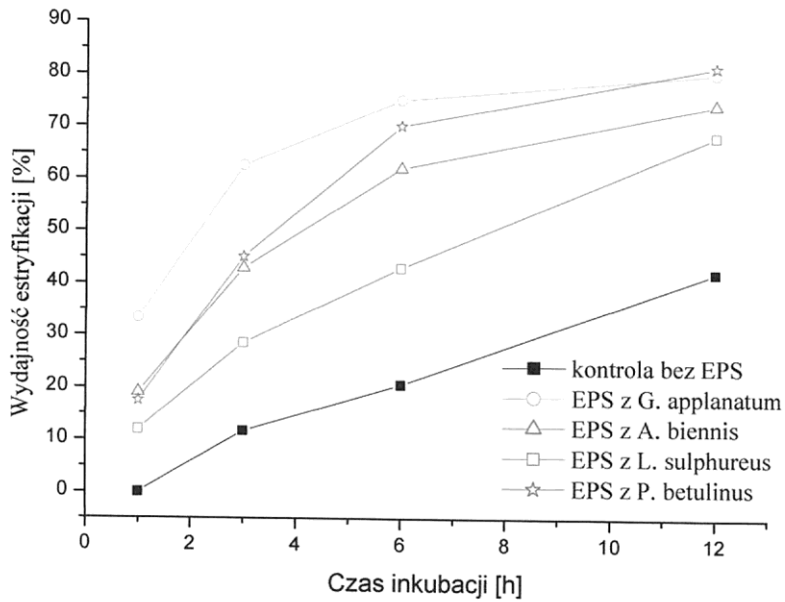


Fig.2