Biokatalizator z grzybni grzyba nitkowatego z rodzaju *Cladosporium* do zastosowania w reakcjach otrzymywania epoksydów terpenoidowych

Przedmiotem wynalazku jest biokatalizator z grzybni grzyba nitkowatego z rodzaju *Cladosporium* do zastosowania w reakcjach otrzymywania epoksydów terpenoidowych, takich jak, epoksyd i diepoksyd limonenu, epoksyd α- i β-pinenu, epoksyd cytronellolu, epoksyd cytronellenu, epoksyd myrcenu, epoksyd myrtenolu, epoksyd alkoholu perylowego, epoksyd cytronellalu, epoksyd werbenolu, epoksyd nerolidolu, epoksyd dihydrokarweolu, znajdujących szerokie zastosowanie do wytwarzania związków smakowo-zapachowych, produktów farmaceutycznych czy biodegradowalnych biopolimerów.

Wynalazek rozwiązuje problem techniczny w postaci zastosowania prostego biokatalizatora w reakcjach otrzymywania epoksydów terpenoidowych przebiegających z dużą wydajnością i wysokimi stężeniami otrzymywanych produktów.

Najcenniejsze związki terpenoidowe takie jak, ketony, epoksydy i diepoksydy limonenu, pinenu, cytronellenu, linalolu, cytronellolu, werbenolu występują w przyrodzie w niskich stężeniach, toteż w niedużych ilościach izolowane są np. z olejków, najczęściej z roślin, poprzez destylację z parą wodną, ale także przez wytłaczanie i ekstrakcję rozpuszczalnikami lub tłuszczami (Schaffner W., Rośliny lecznicze – chemizm, działanie, zastosowanie. 1996, Oficyna Wydawnicza Multico, Warszawa). Procesy takie przebiegają z dużą stratą materiału roślinnego, często o ograniczonym dostępie, co wpływa na wysoką wartość rynkową takich komponentów. Wobec powyższego, około 80% związków aromatycznych obecnych na rynku światowym, produkowanych jest na drodze syntezy chemicznej (Krings U., Berger R.G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Nr 49, 1998). W literaturze, jak np. Mandelli i in. *Applied Catalysis A: General*, 219, 2001; Mahamat Ahmat, Y.; Madadi, S.; Charbonneau, L.; Kaliaguine, S. Epoxidation of Terpenes. Catalysts 2021, 11,; Abrantes M., Neves P., Antunes M., Gago S., Paz F. A. A., Rodrigues A. E., Pillinger M., Gonçalves I. S., Silva C. M., Valente A. A., 2010 czy Microwave-assisted molybdenum-catalysed epoxidation of olefins" *Journal of Molecular*

Catalysis A: Chemical, 320, opisano szereg metod chemicznego otrzymywania epoksydów i diepoksydów terpenowych.

Metody te przebiegają z wykorzystaniem katalizatorów w postaci związków nieorganicznych, jak np. tlenki metali i peroksykwasy, związków organicznych, jak np. dimetylodioksiran, kwas chlorobenzoesowy, czy też metaloorganicznych, jak np. tritlenk metylorenu. Jak wynika z szeregu publikacji, Mahamat Ahmat, Y.; Madadi, S.; Charbonneau, L.; Kaliaguine, S. Epoxidation of Terpenes. *Catalysts* 2021, *11*, *Appl. Catal. A: Gen.*, 219, 2001; *Appl. Catal. A: Gen.* 256 2003; *Catal. Today* 133–135 2008 czy też *Appl. Catal. B Environ.* 2020, 260, wśród wymienionych katalizatorów wiele wykazuje działanie drażniące i zazwyczaj stosunkowo niską regio- i stereoselektywność.

Przykładowo, jak opisują Mandelli i in. *Applied Catalysis A: General,* 219, 2001, epoksydacja limonenu z udziałem Al_2O_3 jako katalizatora, zachodzi z dość niską wydajnością konwersji (max. 70% po 4 godz.) i prowadzi do powstania zarówno monoepoksydów jak i diepoksydów.

Z kolei znany z publikacji autorstwa Ciriminna i in., *ChemComm,* 54, 2018, sposób otrzymywania epoksydu limonenu, przebiega z użyciem sililowanego fotokatalizatora TiO_2 P25 (Sil-P25), cząsteczkowego tlenu jako utleniacza i promieniowania symulującego światło słoneczne. Chemiczne metody otrzymywania epoksydów terpenoidowych z zastosowaniem znanych katalizatorów, wymagają użycia dodatkowych czynników, jak np. promieniowania, są często niekorzystne dla środowiska, ze względu na zastosowanie: toksycznych ligandów, np. butylopirydyny w przypadku tritlenku metylorenu (*J. Mol. Catal. A Chem.*, 358); toksycznych jonów metali, np. kobaltu i niklu (Madadi, S.; Charbonneau, L.; Bergeron, J.Y.; Kaliaguine, S. Aerobic epoxidation of limonene using cobalt substituted mesoporous SBA-16 Part 1: Optimization via Response Surface Methodology (RSM). Appl. Catal. B Environ. 2020, 260), kwasów nieorganicznych, peroksykwasów i ich soli, np. mononadsiarczanu potasu (*ACS Sustainable Chem. Eng.* 2018, 6, 4), które wykazują dodatkowo działanie drażniące i korozyjne. Nierzadko używane są toksyczne związki jak tritlenek metylorenu. Ponadto, produkty uzyskane na drodze syntezy chemicznej, nie są dobrze postrzegane przez konsumentów, którzy preferują związki pochodzenia naturalnego.

Alternatywne sposoby otrzymywania naturalnych terpenowych związków smakowych i zapachowych opierają się na metodach biotechnologicznych, z katalizatorami w postaci wolnych enzymów lub komórek zawierających enzymy.

Wartość związków pozyskanych tymi metodami jest porównywalna z wartością związków otrzymanych w wyniku ekstrakcji. Zaletą metod biotechnologicznych jest także to, że związki otrzymane przy ich użyciu są określane według legislatury USA i Unii Europejskiej, jako naturalne i bezpieczne dla konsumentów (GRAS – *Generally Recognised As Safe*).

Biotransformacje limonenu, α- i β-pinenu, cytronellolu czy linalolu do utlenionych terpenoidów, opisane w literaturze: Sales, A.; Moreira, R.C.; Pastore, G.M.; Bicas, J.L. Process Biochem. 2019, 78; van Keulen F., Correia C., da Fonseca M.M.R J. Mol. Catal. B: Enzym. Nr 5, 1998; Agrawal R., Deepika NU, Joseph R. Biotechnol. Bioeng. Nr 63, 1999; Vidya C.M., Agrawal R. Appl. Microbiol. Biotechnol. Nr 62, 2003; van Dyk MS, van Rensburg E, Moleleki N Biotechnol. Lett. Nr 20, 1998 oraz dokumencie patentowym US 6344350, przebiegające w warunkach tlenowych przy udziale różnych gatunków bakterii, grzybów oraz drożdży, jak np., *Rhodococcus erythropolis*, *Colletotrichum nymphaea*; *Fusarium oxysporum*; *Armillariella mellea*; *Basidiomycetes* sp.; *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671; *Pseudomnas putida* NCIMB 8248; *Bacillus pallidus* BR425; *Aspergillus niger* NC1M 612; *Pleurotus flabellatus*; *Pseudomonas* sp.; *Aspergillus* sp. nie dają zadawalających rezultatów z uwagi na niewielką wydajność i niskie stężenia otrzymywanych produktów. Wynika to zarówno z inaktywacji enzymów przez terpeny, ich dużej lotności i niskiej rozpuszczalności w wodzie, jak również z niestabilności stosowanych biokatalizatorów. W klasycznej metodzie biotransformacji wykorzystującej żywe komórki, tworzone są głównie alkohole, ketony i kwasy terpenoidowe, zaś epoksydy terpenoidowe powstają rzadko, głównie jako produkty uboczne (Grabarczyk, M.; Mączka, W.; Żołnierczyk, A.K.; Wińska, K. Transformations of Monoterpenes with the p-Menthane Skeleton in the Enzymatic System of Bacteria, Fungi and Insects. *Molecules* 2020, 25); drobnoustroje często metabolizują produkt w dalszych etapach reakcji, prowadząc ostatecznie do jego degradacji. Ponadto, bariery dyfuzyjne pomiędzy substratem i centrum aktywnym enzymu, wydłużają znacznie czas biokonwersji (nawet do kilku dni), dlatego konieczne jest intensywne mieszanie układów w celu lepszej wymiany masy między substratami, podłożem i biomasą. Spośród stosowanych biokatalizatorów, lipazy okazują się najbardziej odpowiednie do katalizowania reakcji w rozpuszczalnikach organicznych. Jak opisali Wiemann i in., *Zeitschrift für Naturforschung B*, 67b, 2012, epoksydacja limonenu z wykorzystaniem zimmobilizowanej lipazy B, przebiega z użyciem toluenu jako rozpuszczalnika, H_2O_2 i kwasu kaprylowego jako kosubstratów. Podobna metoda

stosowana jest do otrzymywania epoksydu 1,2-limonenu, opisana w publikacji Melchiors i in., *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58(31), 2019. Reakcję epoksydacji limonemu prowadzi się za pomocą lipazy unieruchomionej na hydrofobowych żywicach polimerowych, z intensywnym mieszaniem (500 RPM) i okresowym zasilaniem limonenem, stosując toluen jako rozpuszczalnik, kwas oktanowy i H_2O_2.

Znane z publikacji J.M.R. Silva i M.G. Nascimento, *Process Biochemistry* 47 (2012) zastosowanie lipazy B z *Candida antarctica* (CalB) do otrzymywania epoksydów cytronellolu, wymaga użycia wodoronadtlenku mocznika jako utleniacza i kwasu oktanowego jako donora grupy acylowej. Inna metoda epoksydacji enancjomerów limonenu przedstawiona w publikacji Biondi i in., *Antioxidants*, 10(9):1462, 2021, polega na użyciu preparatu z mąki owsianej zawierającego peroksygenazę zawieszonej w buforze fosforanowym z dodatkiem wodoronadtlenku *tert*-butylu (t-BuOOH), jako utleniacza.

Z opisu patentowego DE 10055092, znany jest sposób otrzymywania utlenionych pochodnych linalolu, epoksylinalolooksydu i epoksylinalolu wykorzystujący immobilizowaną na żywicy akrylowej lipazę z *Candida antarctica*. Dla osiągnięcia zadowalających wydajności produktów, metoda ta wymaga długiego czasu, nawet do 7 dni. Podobnie, po długotrwałym czasie reakcji, uzyskuje się monoepoksyd kariofilenu z maksymalną wydajnością 64%, stosując jako biokatalizatory w postaci wolnych i immobilizowanych lipaz oraz strzępek grzybów oznaczonych jako UEA_06 i UEA_53, pochodzących z rejonów Amazonii, jak opisali da Silva i in. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 95, 2013.

Z opisu patentowego US2017/0233355 znany jest biokatalizator do epoksydacji terpenów w postaci enzymu o aktywności peroksygenazowej z grzyba topoli *Agrocybe aegerita*. Jego użycie wymaga kilkuetapowego procesu wyodrębniania i oczyszczania. Tym sposobem po 30 min. reakcji w temperaturze od 20 do 40°C, uzyskuje się mieszaninę produktów: maksymalnie 52% monoepoksydu, 33% diepoksydu limonenu oraz alkohol terpenoidowy i 15% karweolu. Wysokie stężenia lotnych i malo rozpuszczalnych w środowisku wodnym monoterpenów, powodują inaktywację biokatalizatorów enzymatycznych.

Przedstawione w stanie techniki biokatalizatory do enzymatycznego otrzymywania epoksydów i diepoksydów terpenoidów wymagają wcześniejszego przygotowania biokatalizatora poprzez wyizolowanie z komórek drobnoustrojów, oczyszczenie i zimmobilizowanie białka enzymatycznego na nośniku. Reakcje

epoksydacji wymagają użycia dodatkowych związków chemicznych, intensywnego mieszania wszystkich reagentów i inaktywacji biokatalizatorów, wpływającej na spadek ich aktywności enzymatycznej, co przedkłada się na wydajność produktów epoksydacji.

Celem wynalazku było opracowanie prostego w przygotowaniu i stosowaniu biokatalizatora umożliwiającego przeprowadzanie reakcji epoksydacji bez jego inaktywacji, z dużą wydajnością produktów.

Istotą wynalazku jest biokatalizator z grzybni grzyba nitkowatego z rodzaju *Cladosporium* do zastosowania w reakcjach otrzymania epoksydów terpenoidowych, z terpenoidów albo terpenów, zawierających jedną lub kilka jednostek izoprenowych.

Korzystnym jest jeśli jako terpenoidy czy terpeny, stosuje się limonen albo α-pinen, albo β-pinen, albo myrcen, albo cytronellen, albo linalol, albo cytronellol, albo myrtenol, albo karwon, albo cytronellal, albo aldehyd perylowy, albo *trans*-pinokarweol, albo alkohol perylowy, albo werbenol, albo dihydrokarweol czy nerolidol. Korzystnym jest jeśli biokatalizator do zastosowania według wynalazku charakteryzuje się tym, że stosuje się go od 1,2% do 6% w stosunku wagowym do rozpuszczalnika, jak np., octanu etylu, albo toluenu, albo mieszaniny buforu fosforanowego z 60% acetonem, który zawiera od 0,44% do 3,8% terpenu albo terpenoidu w stosunku wagowym do rozpuszczalnika i utleniacz, takiego jak, 30% nadtlenek wodoru, od 0,82 do 12,24% w proporcjach wagowych do rozpuszczalnika. Korzystnym jest również jeśli biokatalizator do zastosowania według wynalazku charakteryzuje się tym, że stosuje się go w warunkach temperaturowych 10 do 60°C i w czasie od 1,5 do 9 godzin.

Biokatalizator według wynalazku nie wymaga etapu oczyszczania, może być wykorzystany w kilku następujących po sobie cyklach katalitycznych bez istotnego spadku aktywności, charakteryzuje się wysoką aktywnością epoksydacji łatwo dostępnych naturalnych terpenów, przebiegającej w niskich temperaturach, bez mieszania i bez użycia związków pośrednich jak np. kwasów karboksylowych, z zadowalającą wydajnością i wysoką jakością otrzymywanych produktów.

Wynalazek i jego korzystne skutki zastosowania w reakcjach otrzymania epoksydów terpenoidowych przedstawiono w następujących przykładach.

Przykład 1. Przygotowanie biokatalizatora według wynalazku do użycia w reakcjach epoksydacji terpenoidów i terpenów.

Do 50 ml płynnego podłoża hodowlanego o składzie: 1% oliwy z oliwek, 0,5% glukozy, 0,5% węglanu wapnia, 0,1% ekstraktu drożdżowego, 0,5% $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% K_2HPO_4, 0,02% $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ o pH=6,0 dodano 2 ml zawiesiny zarodników grzyba z rodzaju *Cladosporium* o gęstości $4x10^5$ zarodników w 1 ml, po czym prowadzono hodowlę na wytrząsarce rotacyjnej przez 72 godz. w temp. 20°C. Po przepłukaniu grzybni płynem fizjologicznym, grzybnię zamrożono i poddano liofilizacji przez 24 godziny. Po suszeniu sublimacyjnym grzybnię utarto do postaci proszku i w takiej postaci wykorzystywano w reakcji epoksydacji terpenów. Wydajność otrzymanego biokatalizatora wynosiła 21,3 g na 1 litr podłoża hodowlanego.

Przykład 2. Badanie bioaktywności biokatalizatora według wynalazku.

2.1. Do kolbki zawierającej 5 ml toluenu dodano 60 mg biokatalizatora wg wynalazku, 22 mg limonenu i 41 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono w temperaturze 10°C na 9 godz., po czym oznaczono wydajność produktów za pomocą chromatografii gazowej. Uzyskano 75% epoksydu limonenu i 25% diepoksydu limonenu.

2.2. Do kolbki zawierającej 5 ml mieszaniny buforu fosforanowego z 60% acetonem dodano 150 mg biokatalizatora wg wynalazku, 60 mg α-pinenu i 90 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono w temperaturze 20°C na 6 godz., po czym oznaczono wydajność produktów., jak opisano w przykładzie 2.1. Uzyskano 100% epoksydu α-pinenu.

2.3. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 250 mg biokatalizatora wg wynalazku, 120 mg β-pinenu i 215 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono w temperaturze 40°C na 3 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 76% epoksydu α-pinenu.

2.4. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 300 mg biokatalizatora wg wynalazku, 190 mg linalolu i 350 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono w temperaturze 50°C na 1,5 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 83% epoksylinalolooksydu.

2.5. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 230 mg biokatalizatora wg wynalazku, 65 mg cytronellolu i 400 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono

w temperaturze 60°C na 3 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 90% epoksydu cytronellolu.

2.6. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 160 mg biokatalizatora wg wynalazku, 130 mg myrcenu i 612 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono w temperaturze 40°C na 5 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 98% epoksydu myrcenu.

2.6. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 285 mg biokatalizatora wg wynalazku, 50 mg myrcenu i 332 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono w temperaturze 30°C na 2 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 91% epoksydu myrtenolu.

2.7. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 120 mg biokatalizatora wg wynalazku, 25 mg cytronellenu i 150 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono w temperaturze 15°C na 8 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 90% epoksydu cytronellenu.

2.8. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 280 mg biokatalizatora wg wynalazku, 40 mg cytronellalu i 440 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono bez mieszania w temperaturze 45°C na 1,5 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 50% epoksydu cytronellalu.

2.9. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 80 mg biokatalizatora wg wynalazku, 40 mg alkoholu perylowego i 130 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono bez mieszania w temperaturze 55°C na 2 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 57% epoksydu alkoholu perylowego.

2.10. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 287 mg biokatalizatora wg wynalazku, 58 mg werbenolu i 280 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono w temperaturze 45°C na 1,5 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 75% epoksydu werbenolu.

2.11. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 250 mg biokatalizatora wg wynalazku, 50 mg nerolidolu i 300 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono bez mieszania w temperaturze 60°C na 1,5 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 93% nerolidolu.

2.12. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 190 mg biokatalizatora wg wynalazku, 43 mg dihydrokarweolu i 89 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono bez mieszania w temperaturze 35°C na 4 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 69% epoksydu dihydrokarweolu.

Wydajność poszczególnych reakcji epoksydacji różnych substratów z użyciem biokatalizatora według wynalazku, przedstawiono w tabeli 1.

Przykład 3. Porównanie bioaktywności katalizatora według wynalazku z bioaktywnością znanego katalizatora w reakcjach epoksydacji przykładowych terpenoidów i terpenów.

3.1. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 20 mg znanego biokatalizatora w postaci lipazy z *Thermomyces lanuginosu*, 43 mg limonenu, 89 mg 30% H_2O_2 i 40 mg kwasu octowego. Kolbkę pozostawiono na wytrząsarce w temperaturze 35°C na 4 godz., po czym, w znany z przykładu 2.1 sposób, oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 4,6% epoksydu limonenu.

3.2. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 40 mg znanego biokatalizatora w postaci lipazy z *Thermomyces lanuginosu*, 43 mg α-pinenu, 112 mg 30% H_2O_2 i 55 mg kwasu octowego. Kolbkę pozostawiono na wytrząsarce w temperaturze 55°C na 2 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 7% epoksydu α-pinenu.

3.3. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 40 mg znanego biokatalizatora w postaci lipazy z *Thermomyces lanuginosu*, 43 mg β-pinenu, 112 mg 30% H_2O_2 i 55 mg kwasu octowego. Kolbkę pozostawiono na wytrząsarce w temperaturze 55°C na 2 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 6% epoksydu β-pinenu.

3.4. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 40 mg znanego biokatalizatora w postaci lipazy z *Thermomyces lanuginosu*, 43 mg myrtenolu, 112 mg 30% H_2O_2 i 55 mg kwasu octowego. Kolbkę pozostawiono na wytrząsarce w temperaturze 55°C na 2 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 3% epoksydu myrtenolu.

3.5. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 20 mg znanego biokatalizatora w postaci lipazy z *Thermomyces lanuginosu*, 43 mg limonenu i 89 mg 30% H_2O_2.

Kolbkę pozostawiono bez mieszania w temperaturze 35°C na 4 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 7% epoksydu limonenu.

3.6. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 40 mg znanego biokatalizatora w postaci lipazy z *Thermomyces lanuginosu*, 43 mg α-pinenu, 112 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono bez mieszania w temperaturze 55°C na 2 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 5% epoksydu α-pinenu.

3.7. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 40 mg znanego biokatalizatora w postaci lipazy z *Thermomyces lanuginosu*, 43 mg β-pinenu, 112 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono bez mieszania w temperaturze 55°C na 2 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 8% epoksydu β-pinenu.

3.8. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 40 mg znanego biokatalizatora w postaci lipazy z *Thermomyces lanuginosu*, 43 mg myrtenolu, 112 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono bez mieszania w temperaturze 55°C na 2 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 8% epoksydu myrtenolu.

3.9. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 20 mg biokatalizatora wg wynalazku, 43 mg limonenu i 89 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono bez mieszania w temperaturze 35°C na 4 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 59% epoksydu i 40% diepoksydu limonenu.

3.10. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 40 mg biokatalizatora wg wynalazku, 43 mg α-pinenu, 112 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono bez mieszania w temperaturze 55°C na 2 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 80% epoksydu α-pinenu.

3.11. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 40 mg biokatalizatora wg wynalazku, 43 mg β-pinenu, 112 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono bez mieszania w temperaturze 55°C na 2 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 65% epoksydu β-pinenu.

3.12. Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 40 mg biokatalizatora wg wynalazku, 43 mg myrtenolu, 112 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono bez mieszania w temperaturze 55°C na 2 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 81% epoksydu myrtenolu.

Wydajności reakcji epoksydacji terpenoidów i terpenów z wykorzystaniem znanego biokatalizatora w postaci lipazy z *Thermomyces lanuginosu* i biokatalizatora wg wynalazku przedstawiono w tabeli 2.

Przykład 4. Badanie stabilności biokatalizatora według wynalazku.

Do kolbki zawierającej 5 ml octanu etylu dodano 287 mg biokatalizatora, 58 mg limonenu i 164 mg 30% H_2O_2. Kolbkę pozostawiono w temperaturze 55°C na 3 godz., po czym oznaczono wydajność produktów. Uzyskano 64,5% epoksydu i 33,5% diepoksydu limonenu. Po zakończonej reakcji, biokatalizator odwirowano przez 10 minut przy 9000 RPM, mieszaninę reakcyjną odrzucono, a biokatalizator przepłukano octanem etylu i wykorzystano w drugiej reakcji epoksydacji limonenu przebiegającej w tych samych warunkach co reakcja pierwsza. Biokatalizator wykorzystano w kolejnych ośmiu reakcjach epoksydacji limonenu.

Wydajności reakcji epoksydacji limonenu z wykorzystaniem biokatalizatora wg wynalazku w następujących po sobie reakcjach, przedstawione w tabeli 3 wskazują, na dużą jego stabilność.

Rzecznik patentowy
mgr Maria Brodzicka