

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245235 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **442134**

(22) Data zgłoszenia: **2022.08.25**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.02.26 BUP 09/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.06.03 WUP 23/2024**

(51) MKP:

C12N 11/14 (2006.01)

	(73) Uprawniony z patentu: POLITECHNIKA ŚLĄSKA, Gliwice, PL
	(72) Twórca(-y) wynalazku: ANNA CHROBOK, Zbrośławice, PL PIOTR LATOS, Gliwice, PL ANNA WOLNY, Chorzów, PL
	(74) Pełnomocnik: rzecz. pat. Katarzyna Borkowy, Gliwice, PL

(54) Tytuł:

Sposób immobilizacji enzymów na stałym nośniku

PL 245235 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób immobilizacji enzymów na stałym nośniku modyfikowanym cieczami jonowymi, mający zastosowanie w biokatalizie enzymatycznej jako wysoce stabilny oraz aktywny katalizator przemian chemicznych.

Dotychczas znane są sposoby immobilizacji enzymu na różnych nośnikach nieorganicznych, organicznych czy polimerowych. W celu poprawy stabilności oraz aktywności enzymu na stałym nośniku niezbędna jest modyfikacja nośnika tak, aby wytworzyć jak największe powinowactwo powierzchni, na której ma być zaadsorbowany enzym. Modyfikacja jest złożonym procesem, gdyż następuje głównie poprzez wytworzenie wiązań chemicznych pomiędzy nośnikiem a związkiem chemicznym. Znany jest również sposób immobilizacji enzymu na nieorganicznych nośnikach, który jest modyfikowany cieczami jonowymi.

Z literatury niepatentowej znane są sposoby immobilizacji enzymu na modyfikowanym cieczami jonowymi nośniku nieorganicznym, tj. Al_2O_3 (M. Mori, R.G. Garcia, M.P. Belleville, D. Paolucci-Jeanjean, J. Sanchez, P. Lozano, M. Vaultier, G. Rios, *Catal. Today*, 2005, 104, 313; F.F. Knill, M. Hechinger, W. Kloeckner, M. Verhuelsdonk, F. Buchbender, H. Giese, T. Melin, *Colloids Surf, A: Physiochem. Eng. Aspects*, 2009, 345, 182; S.H. Barghi, M. Adibi, D. Rashtchian, J. Membr. Sci., 2010, 362, 346; D.D. Iarikov, P. Hacarlioglu, S.T. Oyama, *Chem. Eng. J.*, 2011, 166, 401; O.C. Vangeli, G.E. Romanos, K.G. Beltsios, D. Fokas, C.P. Athanasekou, N.K. Kanellopoulos, *J. Membr. Sci.*, 2010, 365, 366), SiO_2 (L.-L. Lou, Y. Dong, K. Yu, S. Jiang, Y. Song, S. Cao, S. Liu, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 2010, 333, 20; H. Zhao, M. Yu, Y. Ding, R. Tan, C. Liu, D. Yin, H. Qiu, D. Yin, *Microporous Mesoporous Mater.*, 2010, 136, 10; Y. Liu, J. Peng, S. Zhai, J. Li, J. Mao, M. Li, H. Qiu, G. Lai, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, 2947; H. Wang, B. Wang, C.-L. Liu, W.-S. Dong, *Microporous Mesoporous Mater.*, 2010, 134, 51; S. Sahoo, P. Kumar, F. Lefebvre, S.B. Halligudi, *Appl. Catal. A: Gen.*, 2009, 354, 17). Immobilizację cieczy jonowej prowadzi się za pomocą wiązania chemicznego poprzez grupę trietoksylilową umieszczoną w kationie cieczy jonowej oraz grupami hydroksylowymi znajdującymi się na powierzchni materiału nieorganicznego.

Ponadto w publikacjach (M. Sobota, M. Schmid, M. Happel, M. Amende, F. Maier, H.-P. Steinrück, N. Paape, P. Wasserscheid, M. Laurin, J.M. Gottfried, J. Libuda, *J. Phys. Chem. Phys.*, 2010, 12, 10610; S. Maruyama, Y. Takeyama, H. Taniguchi, H. Fukumoto, M. Itoh, H. Kumigashira, M. Oshima, T. Yamamoto, Y. Matsumoto, A. CS Nam, 2010, 4, 5946; W. Zhao, M. Zhu, Y. Mo, M. Bai, *Colloids Surf A: Physiochem. Eng. Aspects*, 2009, 332, 78; S. Perkin, T. Albrecht, J. Klein, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, 12, 1243) przedstawiono sposób polegający na wykorzystaniu oddziaływania fizycznego- oraz porowatości materiału nieorganicznego, przy ograniczonej ilości cieczy jonowych zbudowanych z anionów takich jak: trifluorometanosulfonowy, tetrafluoroboranowy, heksafluorofosfoniowy, chlorkowy, dietylosiarczanowy oraz dicyjanoamidowy, bowiem inne struktury anionów mogą powodować hydrolizę białka. Niedogodnością powyższych rozwiązań stosujących takie modyfikacje jest brak uzyskania wysokiej stabilności a po kilku cyklach reakcyjnych wypłukanie cieczy jonowej wraz z enzymem.

CALB to wysoce aktywny i powszechnie stosowany biokatalizator wielu transformacji chemicznych, np. estryfikacji (T. Tanino, T. Ohno, C. Ogino, H. Fukuda, A. Kondo, J. Biosci. Bioeng, 2009, 108, 369), acylowania (O. Langvik, T. Saloranta, D1Y, Murzin, R. Leino, *ChemCatChem*, 2015, 24, 4004) czy otrzymywania węglanu glicerolu (Y. Du, J. Gao, W. Kong, L. Zhou, L. Ma, Y. He, Z. Huang, Y. Jiang, *ACS Omega*, 2018, 3, 6642). Zastosowanie natywnej wersji enzymu, czyli bez osadzania na nośniku, wiąże się najczęściej z niską aktywnością a dodatkowo nie tylko utrudnia proces wydzielania enzymu z mieszaniny poreakcyjnej ale również uniemożliwia jego ponowne użycie, co przekłada się na ograniczenie stosowania takiej formy enzymu w procesach chemicznych. *Aspergillus oryzae* znalazł zastosowanie jako biokatalizator w reakcjach utleniania (F. Tieves, S.J.-P. Willot, M.M.C.H. van Schie, M.C.R. Rauch, S.H.H. Younes, W. Zhang, J. Dong, P.G. de Santos, J.M. Robbins, B. Bommarius, M. Alcalde, A.S. Bommarius, F. Hollmann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2019, 58, 7873), estryfikacji oleju roślinnego (D. Adachi, S. Hama, K. Nakashima, T. Bogaki, C. Ogino, A. Kondo, *Bioresource Technology*, 2013, 135, 410) czy acetalacji (X.-F. Li, Z. Zhu, G.-L. Zhao, Y.-G. Yu, F.-R. Lai, H. Wu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 93, 143).

Z europejskich opisów patentowych EP1692295B1 i EP2776562B1 oraz opisu DK175038B1 znany jest sposób immobilizacji enzymów na nośnikach nieorganicznych, skupiający się na modyfikacji chemicznej nośników nieorganicznych.

Zagadnieniem technicznym wymagającym rozwiązania jest opracowanie aktywnego i stabilnego biokatalizatora z zastosowaniem nieorganicznego nośnika i cieczy jonowej, która jest przyłączona do nośnika za pomocą anionu poprzez silne wiązania wodorowe.

Stwierdzono nieoczekiwanie podczas prowadzonych badań, że zastosowanie cieczy jonowej opartej o anion trifluorometanosulfonowy $[\text{TfO}]^-$ osadzonej na nośnikach nieorganicznych jako matrycy do osadzania enzymów pozwala na znaczne zwiększenie stabilności utworzonego biokatalizatora w wodzie. Dodatkowo biokatalizator charakteryzuje się wysoką aktywnością katalityczną, m.in. w procesie estryfikacji. Wiązania wodorowe wytworzone pomiędzy anionem cieczy jonowej, a nośnikiem są tak silne, że nie zostają zerwane nawet poprzez działanie wody, natomiast duże powinowactwo cieczy jonowej do enzymu umożliwia osadzenie enzymu bez straty jego aktywności.

Sposób immobilizacji enzymów na stałym nośniku polega na tym, że nośnik nieorganiczny miesza się z cieczą jonową posiadającą anion trifluorometanosulfonowy o wzorze ogólnym 1, gdzie R_1 oznacza H lub alkany liniowe $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$, gdzie $n = 1-12$, a R_2, R_3, R_4 , to alkany liniowe, $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$, gdzie $n = 1-18$ przy stosunku masowym cieczy jonowej do nośnika wynoszącym od 1% do 500% w niepolarnym rozpuszczalniku, proces prowadzi się w temperaturze 0°C do 60°C w czasie 5 min do 600 min, sączy próżniowo i przepłukuje 1 do 10 porcjami niepolarnego rozpuszczalnika, następnie suszy w temperaturze od 40°C do 60°C , otrzymany materiał wytrząsa się z enzymem CALB (*Candida antarctica* Lipase B) oraz *Aspergillus oryzae* w stosunku masowym od 10% do 1000% w polarnym rozpuszczalniku w temperaturze 20°C do 40°C w czasie 15 min do 600 min, po czym materiał ponownie sączy się i przepłukuje 1 do 10 porcjami wody oraz suszy próżniowo pod ciśnieniem od 0,01 mbar do 1,00 mbar w temperaturze 20°C do 40°C w czasie 2h do 24h.

Korzystnie w sposobie immobilizacji enzymów według wynalazku jako nośnik nieorganiczny stosuje się krzemionkę, tlenek tytanu(IV), tlenek cyrkonu(IV), krzemian wapnia, tlenek żelaza oraz ich mieszaniny.

Korzystnie w sposobie immobilizacji enzymów według wynalazku jako niepolarny rozpuszczalnik stosuje się heksan, chlorek metylenu, eter naftowy, dichloroetan, trichloroetan lub tetrachloroetan.

Korzystnie w sposobie immobilizacji enzymów według wynalazku jako polarny rozpuszczalnik stosuje się wodę lub acetonitryl.

Zaletą rozwiązania według wynalazku jest możliwość, syntezy heterogenicznego biokatalizatora, który posiada wysoką aktywność i stabilność w środowisku wodnym. Prosty sposób syntezy wykorzystuje wyłącznie oddziaływania fizyczne (wiązania wodorowe pomiędzy nośnikiem a anionem cieczy jonowej).

Przedmiot wynalazku wyjaśniono na poniższych przykładach wykonania.

Przykład 1

Metoda immobilizacji enzymu CALB na krzemionce modyfikowanej triflanem N-metylo-N,N,N-trioktyloamoniowym

Do kolby okrągłodennej o pojemności 25 ml wprowadza się 0,5 g SiO_2 , 2,0 g triflanu N-metylo-N,N,N-trioktyloamoniowego oraz 10 ml chlorku metylenu. Kolbę umieszcza się na mieszadle magnetycznym i miesza się 120 minut w temperaturze pokojowej, po czym materiał sączy się próżniowo i przemywa 3 porcjami 10 ml chlorku metylenu i suszy na wyparce rotacyjnej w temperaturze 50°C przez 2 godziny. Materiał przenosi się do kolby o pojemności 50 ml dodaje się 3,5 g enzymu CALB oraz 10 ml wody. Kolbę umieszcza się w wytrząsarce w temperaturze pokojowej, po czym materiał sączy się grawitacyjnie i przepłukuje 5 porcjami 10 ml wody i suszy się na linii Schlenka w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem 0,1 mbara przez 24 godziny otrzymując 0,59 g katalizatora.

Przykład 2

Metoda immobilizacji enzymu CALB na tlenku tytanu modyfikowanym triflanem 1-metylo-3-oktyloimidazoliowym

Do kolby okrągłodennej o pojemności 25 ml wprowadza się 0,4 g TiO_2 , 1,8 g triflanu 1-metylo-3-oktyloimidazoliowego oraz 10 ml chlorku metylenu. Kolbę umieszcza się na mieszadle magnetycznym i miesza się 120 minut w temperaturze pokojowej, po czym materiał sączy się próżniowo i przemywa 3 porcjami 10 ml chlorku metylenu i suszy na wyparce rotacyjnej w temperaturze 50°C przez 2 godziny. Materiał przenosi się do kolby o pojemności 50 ml dodaje się 3,2 g enzymu CALB oraz 10 ml wody. Kolbę umieszcza się w wytrząsarce w temperaturze pokojowej, po czym materiał sączy się grawitacyjnie i przepłukuje 5 porcjami 10 ml wody i suszy się na linii Schlenka w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem 0,1 mbara przez 24 godziny otrzymując 0,61 g katalizatora.

Przykład 3**Metoda immobilizacji enzymu CALB na krzemianie wapniu modyfikowanym triflanem 1-metylo-3-oktyloimidazoliowym**

Do kolby okrągłodennej o pojemności 25 ml wprowadza się 0,5 g CaSiO_3 , 4,0 g triflanu 1-metylo-3-oktyloimidazoliowego oraz 10 ml heksanu. Kolbę umieszcza się na mieszadle magnetycznym i miesza się 240 minut w temperaturze 30°C , po czym materiał sączy się próżniowo i przemywa 5 porcjami 10 ml heksanu i suszy na wyparce rotacyjnej w temperaturze 50°C przez 2 godziny. Materiał przenosi się do kolby o pojemności 50 ml dodaje się 4,0 g enzymu CALB oraz 15 ml acetonitrylu. Kolbę umieszcza się w wytrząsarce w temperaturze pokojowej, po czym materiał sączy się grawitacyjnie i przepłukuje 5 porcjami 15 ml acetonitrylu i suszy się na linii Schlenka w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem 0,1 mbara przez 24 godziny otrzymując 0,58 g katalizatora.

Przykład 4**Metoda immobilizacji enzymu *Aspergillus oryzae* na tlenku magnezu modyfikowanym triflanem N-oktylopirydyniowym**

Do kolby okrągłodennej o pojemności 25 ml wprowadza się 0,2 g MgO , 2,0 g triflanu N-oktylopirydyniowego oraz 6 ml eteru naftowego. Kolbę umieszcza się na mieszadle magnetycznym i miesza się 600 minut w temperaturze pokojowej, po czym materiał sączy się próżniowo i przemywa 3 porcjami 10 ml eteru naftowego i suszy na wyparce rotacyjnej w temperaturze 50°C przez 2 godziny. Materiał przenosi się do kolby o pojemności 50 ml dodaje się 2,5 g enzymu *Aspergillus oryzae* oraz 10 ml wody. Kolbę umieszcza się w wytrząsarce w temperaturze pokojowej, po czym materiał sączy się grawitacyjnie i przepłukuje 7 porcjami 10 ml wody i suszy się na linii Schlenka w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem 0,1 mbara przez 16 godzin otrzymując 0,59 g katalizatora.

Przykład 5**Metoda immobilizacji enzymu *Aspergillus oryzae* na tlenku cyrkonu modyfikowanym triflanem N-metylo-N-oktylopirolidyniowy**

Do kolby okrągłodennej o pojemności 25 ml wprowadza się 0,6 g ZrO_3 , 3,5 g triflanu N-metylo-N-oktylopirolidyniowego oraz 10 ml dichloroetanu. Kolbę umieszcza się na mieszadle magnetycznym i miesza się 60 minut w temperaturze pokojowej, po czym materiał sączy się próżniowo i przemywa 8 porcjami 10 ml dichloroetanu i suszy na wyparce rotacyjnej w temperaturze 60°C przez 2 godziny. Materiał przenosi się do kolby o pojemności 50 ml dodaje się 2,0 g enzymu *Aspergillus oryzae* oraz 10 ml acetonitrylu. Kolbę umieszcza się w wytrząsarce w temperaturze pokojowej, po czym materiał sączy się grawitacyjnie i przepłukuje 5 porcjami 10 ml acetonitrylu i suszy się na linii Schlenka w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem 0,01 mbara przez 12 godzin otrzymując 0,60 g katalizatora.

Przykład 6**Metoda immobilizacji enzymu *Aspergillus oryzae* na krzemionce modyfikowanej tlenkiem magnezu modyfikowanym triflanem N-metylo-N-oktylopirolidyniowy**

Do kolby okrągłodennej o pojemności 25 ml wprowadza się 0,5 g MgO-SiO_2 , 3,0 g triflanu N-metylo-N-oktylopirolidyniowy oraz 10 ml trichloroetanu. Kolbę umieszcza się na mieszadle magnetycznym i miesza się 300 minut w temperaturze 0°C , po czym materiał sączy się próżniowo i przemywa 3 porcjami 10 ml trichloroetanu i suszy na wyparce rotacyjnej w temperaturze 40°C przez 2 godziny. Materiał przenosi się do kolby o pojemności 50 ml dodaje się 2,5 g enzymu *Aspergillus oryzae* oraz 10 ml wody. Kolbę umieszcza się w wytrząsarce w temperaturze pokojowej, po czym materiał sączy się grawitacyjnie i przepłukuje 5 porcjami 10 ml wody i suszy się na linii Schlenka w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem 0,1 mbara przez 24 godziny otrzymując 0,57 g katalizatora.

Przykład 7**Metoda immobilizacji enzymu *Aspergillus oryzae* na tlenku żelaza modyfikowanym triflanem N-oktylopirydyniowym**

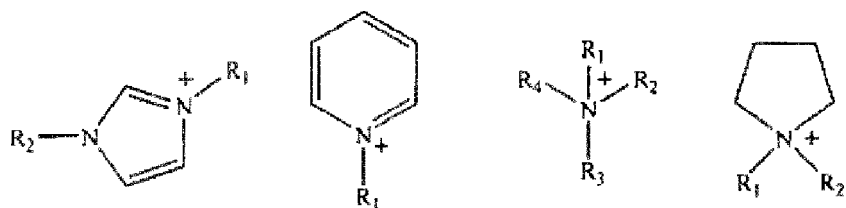
Do kolby okrągłodennej o pojemności 25 ml wprowadza się 0,25 g Fe_3O_4 , 1,5 g triflanu N-oktylopirydyniowy oraz 10 ml tetrachloroetanu. Kolbę umieszcza się na mieszadle magnetycznym i miesza się 180 minut w temperaturze pokojowej, po czym materiał sączy się próżniowo i przemywa 4 porcjami 10 ml tetrachloroetanu i suszy na wyparce rotacyjnej w temperaturze 50°C przez 2 godziny. Materiał przenosi się do kolby o pojemności 50 ml dodaje się 2,0 g enzymu *Aspergillus oryzae* oraz 10 ml wody. Kolbę umieszcza się w wytrząsarce w temperaturze pokojowej, po czym materiał sączy się grawitacyjnie i przepłukuje 5 porcjami 10 ml wody i suszy się na linii Schlenka w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem 0,1 mbara przez 24 godziny otrzymując 0,59 g katalizatora.

Zastrzeżenia patentowe

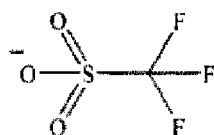
1. Sposób immobilizacji enzymów na, stałym nośniku **znamienny tym**, że. nośnik nieorganiczny miesza się z cieczą jonową posiadającą anion trifluorometanosulfonowy o wzorze ogólnym 1, gdzie R_1 oznacza H lub alkany liniowe C_nH_{2n+2} , gdzie $n = 1-12$, a R_2, R_3, R_4 , to alkany liniowe C_nH_{2n+2} , gdzie $n = 1-18$ przy stosunku masowym cieczy jonowej do nośnika wynoszącym od 1% do 500% w niepolarnym rozpuszczalniku, proces prowadzi się w temperaturze $0^{\circ}C$ do $60^{\circ}C$ w czasie 5 min do 600 min, sączy próżniowo i przepłukuje 1 do 10 porcjami niepolarnego rozpuszczalnika, następnie suszy w temperaturze od $40^{\circ}C$ do $60^{\circ}C$, otrzymany materiał wytrząsa się z enzymem CALB (Candida antarctica Lipase B) oraz Aspergillus oryzae w stosunku masowym od 10% do 1000% w polarnym rozpuszczalniku w temperaturze $20^{\circ}C$ do $40^{\circ}C$ w czasie 15 min do 600 min, po czym materiał ponownie sączy się i przepłukuje 1 do 10 porcjami wody oraz suszy próżniowo pod ciśnieniem od 0,01 mbar do 1,00 mbar w temperaturze $20^{\circ}C$ do $40^{\circ}C$ w czasie 2 h do 24 h.
2. Sposób immobilizacji enzymów według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako nośnik nieorganiczny stosuje się krzemionkę, tlenek tytanu(IV), tlenek cyrkonu(IV), krzemian wapnia, tlenek żelaza oraz ich mieszaniny.
3. Sposób immobilizacji enzymów według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako niepolarny rozpuszczalnik stosuje się heksan, chlorek metylenu, eter naftowy, dichloroetan, trichloroetan lub tetrachloroetan.
4. Sposób immobilizacji enzymów według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako polarny rozpuszczalnik stosuje się wodę lub acetonitryl.

Rysunki

KATIONY



ANION



R_1 to H lub alkany liniowe C_nH_{2n+2} , gdzie $n = 1 - 18$, R_2, R_3, R_4 , to alkany liniowe C_nH_{2n+2} , gdzie $n = 1 - 18$.

Wzór 1