

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **237211**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426040**

(22) Data zgłoszenia: **25.06.2018**

(51) Int. Cl.

C12P 3/00 (2006.01)

B82Y 40/00 (2011.01)

C12R 1/77 (2006.01)

(54) **Sposób otrzymywania nanocząstek krzemionki z wykorzystaniem biokatalizatora**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
25.02.2019 BUP 05/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
22.03.2021 WUP 06/21

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ALEKSANDRA PIELA, Wilczyce, PL

MAGDALENA KLIMEK-OCHAB, Wrocław, PL

**MAŁGORZATA BRZEZIŃSKA-RODAK,
Wrocław, PL**

EWA ŻYMAŃCZYK-DUDA, Smolec, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Meissner

PL 237211 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nanocząstek krzemionki z wykorzystaniem biokatalizatora, które znajdują zastosowanie w przemyśle biomedycznym oraz farmaceutycznym jako nośnik genów, białek, leków, środków obrazujących oraz jako biosensor.

W publikacji Okoronkwo E.A. i inni p.t. „Development of silica nanoparticle from corn cob ash” w *Advances in Nanoparticles* 2016, 5, 135–139 i w publikacji Shim J. i inni p.t. „Extraction and physical characterization of amorphous silica made from corn cob ash at variable pH conditions via sol gel processing” w *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2015, 30, 249–253 oraz w publikacji Okoronkwo E.A. i inni p.t. „Extraction and characterization of amorphous silica from corn cob ash by sol-gel method” w *Chemistry and Materials Research* 2013, 3, 68–72, a także w publikacji Velmurugan P. i inni p.t. „Extraction, characterization, and catalytic potential of amorphous silica from corn cobs by sol-gel method” w *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2015, 29, 298–303 opisano procedurę otrzymywania nanocząstek krzemionki z całych kolb kukurydzy, które zostały uprzednio spopielone. Wykorzystano metodę ekstrakcji zol-żel. W publikacji Mohanraj K. i inni p.t. „Preparation and characterization of Nano SiO₂ from corn cob ash by precipitation method” w *Optoelectronics and Advanced Materials-Rapid Communications* 2012, 6, 394–397 opisano procedurę otrzymywania nanocząstek krzemionki z całych kolb kukurydzy, które także zostały uprzednio spopielone. Wykorzystano metodę precypitacji. W publikacji Saleem M. i inni p.t. „Synthesis of precipitated silica from corn cob by using organic acids” w *Science International (Lahore)* 2014, 27, 265–269 opisano procedurę otrzymywania nanocząstek krzemionki z kolb kukurydzy z wykorzystaniem kwasów organicznych.

W ostatnich latach procesy związane z zagospodarowaniem odpadów pochodzących z przemyśłu rolnego stanowią obiekt badań na całym świecie. Szczególne zainteresowanie wśród naukowców wzbudzają biokonwersje z wykorzystaniem mikroorganizmów, które to metody w porównaniu do metod chemicznych stanowią ekologiczną i ekonomiczną alternatywę otrzymywania nanocząstek krzemionki, mających istotne zastosowanie w wielu dziedzinach naszego życia. Krzemionka jest jednym z najważniejszych związków nieorganicznych pod względem zastosowań technologicznych, dlatego synteza nanocząstek i nanokompozytów krzemionkowych jest przedmiotem intensywnych badań. Nanocząstki na bazie krzemionki są stosowane między innymi przy produkcji opon samochodowych oraz wszędzie tam, gdzie wymagany jest wypełniacz o wymiarach nano, np. w farbách, ceramice, gumie, materiałach magnetycznych, szkle, kosmetykach oraz lekach. Ze względu na bardzo różnorodne możliwości zastosowań komercyjnych rośnie zapotrzebowanie na produkcję nanokrzemionki o zdefiniowanych parametrach.

Biosynteza nanocząstek krzemionki z wykorzystaniem osłon kolb kukurydzy oraz *F. culmorum* nie została dotychczas opisana w literaturze naukowej ani patentowej.

Istotą wynalazku jest sposób biosyntezy nanocząstek krzemionki z wykorzystaniem biokatalizatora, polegający na tym, że jako substrat stosuje się liście osłon z kolb kukurydzy oraz świeżą biomasę *F. culmorum* jako biokatalizator w siedmiodniowym procesie biotransformacji i otrzymuje się sferyczne nanocząstki krzemionki o rozmiarze od 40 do 70 nm.

Korzystnie biokatalizator otrzymuje się hodując mikroorganizm w warunkach hodowli wglębnej, okresowej na podłożu mineralnym Czapek-Dox.

Korzystnie optymalny czas hodowli *F. culmorum* to 4 dni w 27°C na wytrząsarce rotacyjnej (130 rpm).

Korzystnie czas biotransformacji potrzebny do uzyskania najwyższego stężenia krzemionki wynosi 7 dni.

Korzystnie produkt biotransformacji w postaci sferycznych nanocząstek krzemionki o rozmiarze od 40 do 70 nm – zdjęcie 1, zdjęcie 2 – analizowany jest za pomocą STEM, EDX, FTIR oraz ICP-OES.

Zaletą sposobu według wynalazku jest umożliwienie uzyskania nanocząstek krzemionki biometodą zaliczaną do zielonej chemii oraz to, że biokonwersja w procesie wynosi 47% i jest liczona poprzez oznaczenie ubytku krzemionki z osłon kolb kukurydzy i pomiar uwolnionej krzemionki w płynie pobiotransformacyjnym, po przeprowadzonym procesie.

Sposób wynalazku został przedstawiony w przykładzie wykonania oraz na rysunkach, na których Fig. 1 oraz Fig. 2 przedstawia budowę nanocząstek, Fig. 3 przedstawia widmo.

Przykład 1

Podłoże Czapek-Dox przygotowuje się na podstawie przepisu nr 130 w bazie DSMZ z jedną zmianą. Do 1 litra wody destylowanej dodaje się 30 g sacharozy, 0,5 g chlorku potasu (KCl), 0,5 g

siedmiowodnego siarczanu magnezu ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.01 g siedmiowodnego siarczanu żelaza ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 2.64 g siarczanu amonu ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) oraz 1 g wodorofosforanu dipotasu (K_2HPO_4). Roztwór doprowadza się do pH 7.2 i sterylizuje termicznie.

Do 100 ml medium znajdującego się w kolbie stożkowej o pojemności 250 ml dodaje się 0.5 ml zawiesiny zarodników, pobranych z płytki hodowlanej przemyciej 0.05%-owym roztworem Tritonu X-100. Hodowlę *F. culmorum* prowadzi się na wytrząsarce rotacyjnej 130 rpm w temperaturze 27°C. Proces wzrostu mycelium prowadzi się do osiągnięcia fazy wzrostu logarytmicznego, którą wyznacza się na podstawie zależności przyrostu biomasy od czasu trwania hodowli – w tym przypadku było to 96 h. Następnie biomasę oddziela się poprzez filtrację na sączku karbowanym, przemyciwa wodą i umieszcza w kolbach – po 10 g w 100 ml wody destylowanej na 24 godziny na wytrząsarce rotacyjnej 130 rpm – w warunkach deficytu składników odżywczych.

Przygotowanie substratu obejmuje sterylizację 4 g osłon kolb kukurydzy w 100 ml wody destylowanej w kolbach o objętości 250 ml w autoklawie (15 min, 121°C, 1.5 atm). Do tak przygotowanych substratów przenosi się sterylnie po 10 g mokrej biomasy/kolba. Próby kontrolne to sterylny substrat bez biokatalizatora. Tak przygotowane kolby umieszczono na wytrząsarce rotacyjnej 130 rpm na 16 dni. W trakcie procesu biokonwersji każdego dnia sterylnie pobierano z każdej próby właściwej i kontrolnej po 1 ml próbki płynu poreakcyjnego i zamrażano w próbkach Eppendorfa w -18°C, do zakończenia procesu. Po oznaczeniu stężenia krzemionki w próbkach za pomocą metody kolorymetrycznej polegającej na redukcji do błękitu heteropolowego, powtarzano powyższe czynności kończąc biokonwersję w dniu o najwyższym stężeniu krzemionki. Metoda ta bazuje na tworzeniu w środowisku kwaśnym kwasu molibdenowo-krzemowego z krzemu będącego w roztworze w postaci krzemionki zjonizowanej i kwasu molibdenowego. Kwas molibdenowo-krzemowy ma zielonożółte zabarwienie, które po dodaniu chlorku cyny (II) jest redukowane do błękitu heteropolowego. Kwas szczawiowy dodawany w trakcie analizy rozkłada barwny kwas molibdenowo-fosforowy. Wartość absorbancji roztworu błękitu heteropolowego mierzona przy długości fali 812 nm jest proporcjonalna do stężenia krzemionki. próbki zebrane w próbkach Eppendorfa rozmrażano i odwirowano (5 min, 10000 rpm, 21°C). Do statywu ze szklanymi próbkami przeniesiono po 0.5 ml płynu z nad osadu. Do każdej próbki dodano się 250 µl roztworu molibdenianu amonu (45 ml wody destylowanej, 2.5 ml kwasu siarkowego (VI), 2.5 g molibdenianu amonu), następnie całość mieszało. Po odczekaniu 10 minut dodano 250 µl 10%-owego roztworu kwasu szczawiowego, mieszało i po odczekaniu 2 minut dodano 250 µl roztworu chlorku cyny (II) (10 ml gliceryny, 0.25 g chlorku cyny (II)). Do każdej z próbek dodano po 10 ml wody destylowanej i ponownie mieszało. Absorbancję mierzono przy długości fali 812 nm względem odnośnika zawierającego 0,5 ml wody destylowanej zamiast próbki.

Siądmy dzień biotransformacji jest czasem potrzebnym do uzyskania najwyższego stężenia nanokrzemionki w płynie poreakcyjnym, wynosi ono 5.9 mg/L. Po ponownym nastawieniu biotransformacji i zakończeniu jej w 7 dniu, zawartość kolb filtrowano na sączku karbowanym, a płyn pobiotransformacyjny oraz osłony kolb kukurydzy suszono w 200°C w suszarce laboratoryjnej. Tak przygotowane próbki spopieleno w 600°C w piecu muflowym i badano za pomocą STEM, EDX, FTIR oraz ICP-OES. Dzięki STEM sprawdzano obecność nanocząstek oraz określono ich kształt i rozmiar. Analiza EDX umożliwia identyfikację nanocząstek oraz ich skład. Analiza FTIR określa obecność wiązań w całej objętości próbki. Widmo FTIR prób kontrolnych (K600) i widmo próby właściwej (P600) widoczne jako załącznik „Widmo 1” potwierdza obecność wiązań siloksanowych (Si-O-Si) w obrębie pasma 900–1300 cm^{-1} , natomiast sygnał w obrębie 400–700 cm^{-1} świadczy o występowaniu grup O-Si-O, co dowodzi obecności krzemionki w obu próbkach. Sygnały pochodzące z próby właściwej są zdecydowanie wyższe od tych z próby kontrolnej, co jest dowodem na zdolność *F. culmorum* do efektywnej produkcji nanokrzemionki. Analiza ICP-OES umożliwia określenie ilości krzemionki zarówno w osłonach kolb kukurydzy jak i w płynie pobiotransformacyjnym i co za tym idzie – efektywności procesu.

Produkt otrzymany według przykładu posiada następujące cechy:

Nanocząstki krzemionki posiadają sferyczny kształt oraz wymiary od 40 do 70 nm.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób biosyntezy nanocząstek krzemionki z wykorzystaniem biokatalizatora **znamienny tym**, że jako substrat stosuje się liście osłon z kolb kukurydzy oraz świeżą biomasę *F. culmorum* jako biokatalizator w siedmio-dniowym procesie biotransformacji i otrzymuje się sferyczne nanocząstki krzemionki o rozmiarze od 40 do 70 nm.
2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że biokatalizator otrzymuje się hodując mikroorganizm w warunkach hodowli wgłębnej, okresowej na podłożu mineralnym Czapek-Dox.
3. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że optymalny czas hodowli *F. culmorum* to 4 dni w 27°C na wytrząsarce rotacyjnej (130 rpm).
4. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że czas biotransformacji potrzebny do uzyskania najwyższego stężenia krzemionki wynosi 7 dni.
5. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że produkt biotransformacji w postaci sferycznych nanocząstek krzemionki o rozmiarze od 40 do 70 nm.

Rysunki

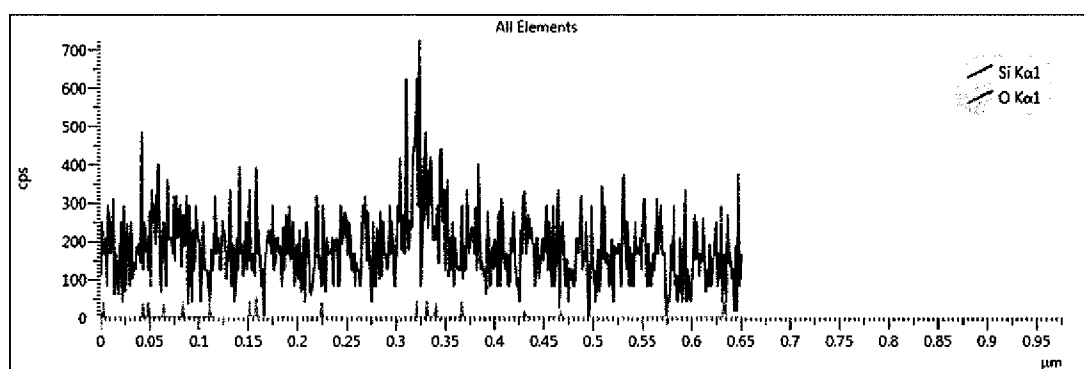
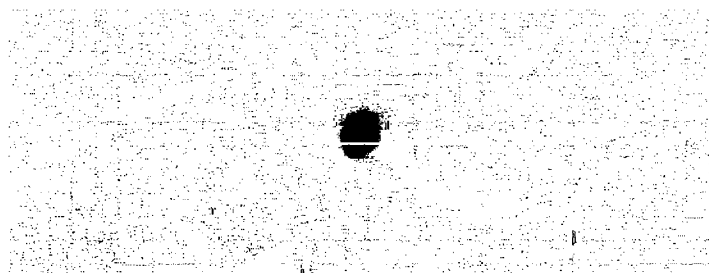


Fig. 1

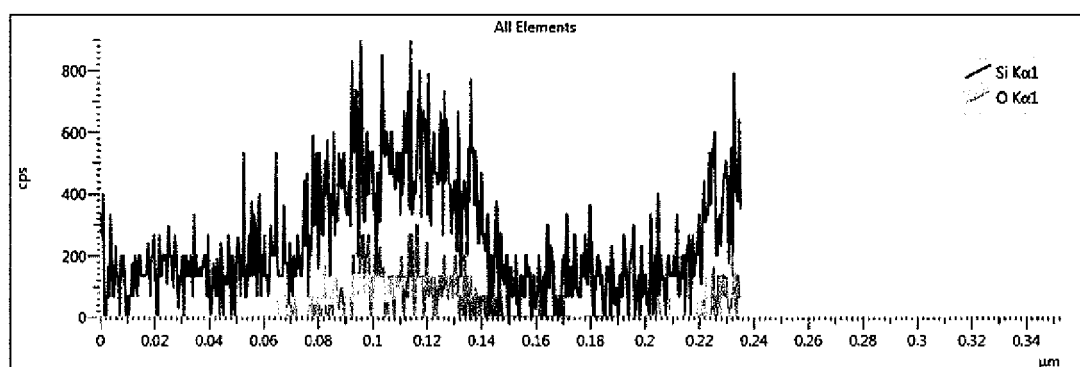
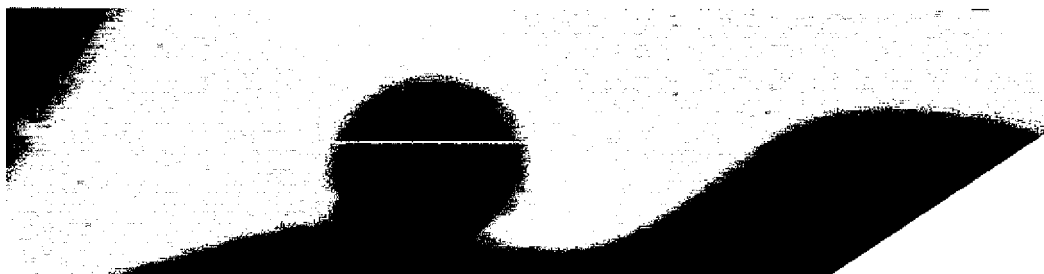


Fig. 2

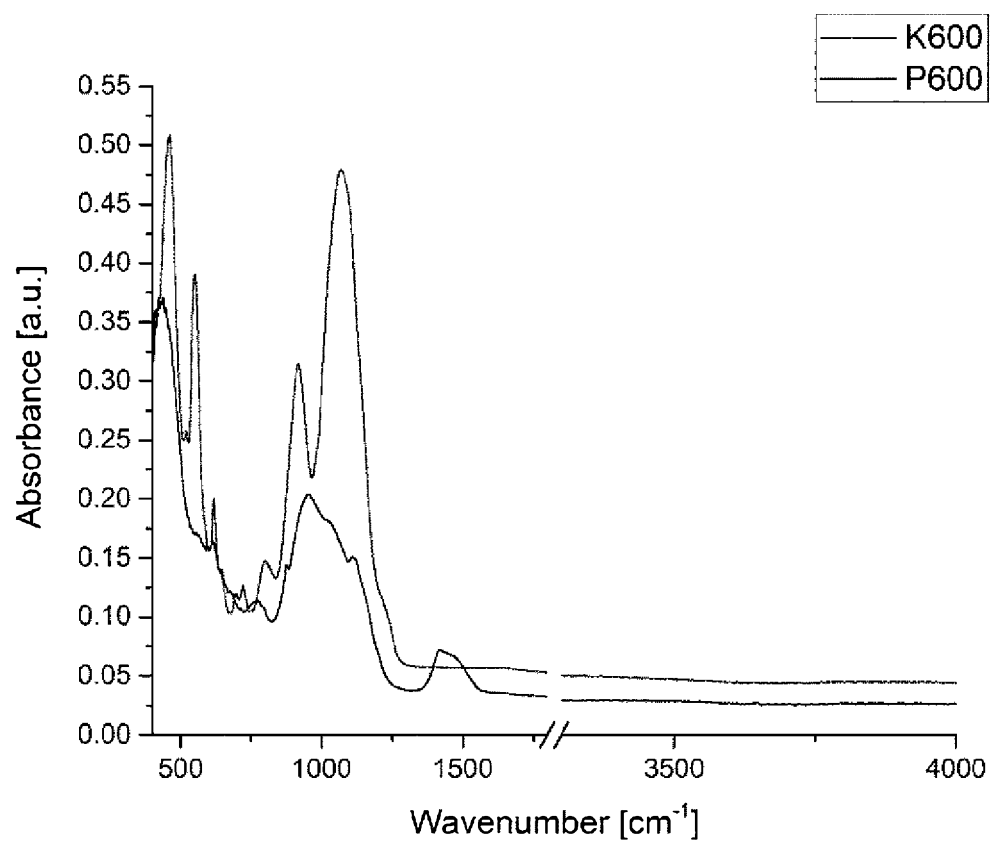


Fig. 3