



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **404594**

(22) Data zgłoszenia: **08.07.2013**

(51) Int.Cl.

C12P 1/02 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

C12R 1/785 (2006.01)

(54) **Sposób otrzymywania nierozpuszczalnego preparatu lipazy
oraz sposób wytwarzania estrów kwasów tłuszczowych w obecności
tego preparatu jako katalizatora enzymatycznego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

19.01.2015 BUP 02/15

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.01.2018 WUP 01/18

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL
INSTYTUT TECHNOLOGII EKSPLOATACJI
– PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY,
Radom, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

TADEUSZ ANT CZAK, Łódź, PL
MIROŚŁAWA SZCZĘSNA-ANT CZAK, Łódź, PL
KRZYSZTOF MAKOWSKI, Zgierz, PL
ELŻBIETA SIWIEC, Radom, PL
ŁUKASZ STAŃCZYK, Łódź, PL
EWA PAWELEC, Radom, PL
AGNIESZKA BOROWSKA, Ozorków, PL
MONIKA MAKOWSKA, Radom, PL
KATARZYNA STRUSZCZYK-ŚWITA,
Rosanów, PL
MARIAN GRĄDKOWSKI, Radom, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nierozpuszczalnego preparatu lipazy oraz sposób wytwarzania estrów kwasów tłuszczowych w obecności tego preparatu jako katalizatora enzymatycznego.

Z opisu zgłoszenia patentowego P. 396515 jest znany sposób otrzymywania nierozpuszczalnego preparatu lipazy *Mucor circinelloides* katalizującego syntezę strukturyzowanych triacylogliceroli, w drodze hodowli selektanta pleśni *Mucor circinelloides* T66/IBPUA 100, którego zarodniki hodzi się na podłożu stałym zawierającym agar, brzeczkę piwowarską, tristearynian glicerolu, hodowlę inokulum selektanta prowadzi się w podłożu ciekłym zawierającym oliwę z oliwek lub olej, namok kukurydziany, wodę wodociągową, a nadto tristearynian glicerolu, zaś hodowlę produkcyjną selektanta prowadzi się na podłożu ciekłym zawierającym oliwę z oliwek lub olej, namok kukurydziany i wodę wodociągową, zaszczerpieniem inokulum użytym w ilości 10% objętościowych stosunku do objętości podłoża, przy mieszaniu zawartości fermentom za pomocą mieszadła, do którego przymocowuje się rozłącznie porowaty nośnik hodowanego selektanta w postaci prostopadłościennych płyt pianki poliuretanowej, a otrzymane w wyniku hodowli płyty pianki z przerośniętą biomasą selektanta *Mucor circinelloides* T66/IBPUA 100 oddziela się od cieczy pohodowlanej, przemywa się wodą destylowaną, odwadnia acetonem schłodzonym do temperatury 4°C, ekstrahuje eterem naftowym i suszy w temperaturze pokojowej lub przemywa wodą destylowaną, zamraża do temperatury -45°C, liofilizuje, przemywa acetonem, eterem naftowym i suszy w temperaturze pokojowej.

W opisie patentowym P. 396516 ujawniono sposób otrzymywania nierozpuszczalnego preparatu lipazy *Mucor circinelloides* katalizującego hydrolizę oligolipidów, w drodze hodowli selektanta pleśni *Mucor circinelloides* M58/IBPUH 120, którego zarodniki hodzi się na podłożu stałym zawierającym agar, brzeczkę piwowarską, a nadto distearynian glikolu polietylenowego, hodowlę inokulum selektanta prowadzi się w podłożu ciekłym zawierającym oliwę z oliwek lub olej, namok kukurydziany, wodę wodociągową, a nadto distearynian glikolu polietylenowego, stosując 1 cm³ zarodników na 100 cm³ podłoża, zaś hodowlę produkcyjną prowadzi się na podłożu ciekłym zawierającym oliwę z oliwek lub olej, namok kukurydziany i wodę wodociągową, zaszczerpieniem inokulum użytym w ilości 10% objętościowych stosunku do objętości podłoża, przy mieszaniu zawartości fermentora za pomocą mieszadła, do którego przymocowuje się rozłącznie porowaty nośnik hodowanego selektanta w postaci prostopadłościennych płyt pianki poliuretanowej, zaś otrzymane w wyniku hodowli płyty pianki z przerośniętą biomasą selektanta *Mucor circinelloides* M58/IBPUH 120 oddziela się od cieczy pohodowlanej, przemywa się wodą destylowaną, odwadnia acetonem schłodzonym do temperatury 4°C, ekstrahuje eterem naftowym i suszy w temperaturze pokojowej lub przemywa wodą destylowaną, zamraża do temperatury -45°C, liofilizuje, przemywa acetonem, eterem naftowym i suszy w temperaturze pokojowej.

Z opisu patentowego PL 206173 znany jest sposób wytwarzania estrów etylowych wyższych kwasów tłuszczowych z olejów roślinnych i etanolu w obecności immobilizowanej lipazy *Mucor circinelloides* jako katalizatora enzymatycznego, w którym olej i etanol zmieszane w stosunku molowym od 1:10 do 10:1 poddaje się transestryfikacji w środowisku samych substratów lub w środowisku rozpuszczalnika organicznego zastosowanego w stosunku objętościowym do substratów od 1:10 do 10:1, w obecności lipazy *Mucor circinelloides* użytej w ilości 0,1–10% w stosunku do masy mieszaniny reakcyjnej, w temperaturze 10–80°C w czasie 1–96 godzin, po czym z mieszaniny poreakcyjnej oddziela się enzym, nadmiar etanolu i w przypadku użycia rozpuszczalnika także rozpuszczalnik i poddaje ją rozdzielaniu na dwie warstwy, z których górną stanowi ester, zaś dolną glicerol.

Natomiast z opisu patentowego PL 206174 jest znany sposób wytwarzania estrów metylowych wyższych kwasów tłuszczowych z olejów roślinnych i metanolu w obecności immobilizowanej lipazy *Mucor circinelloides* jako katalizatora enzymatycznego, w którym olej i metanol zmieszane w stosunku molowym od 1:10 do 10:1 poddaje się transestryfikacji w środowisku samych substratów lub w środowisku rozpuszczalnika organicznego zastosowanego w stosunku objętościowym do substratów od 1:10 do 10:1, w obecności lipazy *Mucor circinelloides* użytej w ilości 0,1–10% w stosunku do masy mieszaniny reakcyjnej, w temperaturze 10–80°C w czasie 1–96 godzin, po czym z mieszaniny poreakcyjnej oddziela się enzym i w przypadku użycia rozpuszczalnika także rozpuszczalnik i poddaje mieszaninę poreakcyjną rozdzielaniu na dwie warstwy, z których górną stanowi ester, zaś dolną glicerol.

W kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej znajduje się szczep pleśni *Mucor circinelloides* TB, wyodrębniony z pancerzy krewetek.

Sposób otrzymywania nierozpuszczalnego preparatu lipazy *Mucor circinelloides* w drodze hodowli pleśni *Mucor circinelloides*, polegający na hodowli zarodników pleśni na wysterylizowanym, stałym podłożu zawierającym agar w temperaturze 29–31°C w czasie 3–5 dni, następnie zmyciu wyhodowanych zarodników sterylną solą fizjologiczną z dodatkiem surfaktanta, zaszczepieniu zawieszoną zarodników wysterylizowanego, ciepłego podłoża aktywującego zawierającego namok kukurydziany i wodę wodociągową, o wyjściowym pH 4,6–5,0 i prowadzeniu w tym podłożu hodowli wstrząsanej inokulum w temperaturze 28–31°C w czasie 18 godzin przy stopniu napełnienia kolb 20% i szybkości obrotowej wstrząsarki 220 minut⁻¹, następnie zaszczepieniu otrzymanym inokulum wysterylizowanego i wstępnie napowietrzonego sterylnym powietrzem, ciepłego podłoża produkcyjnego zawierającego namok kukurydziany i wodę wodociągową i prowadzeniu hodowli produkcyjnej w temperaturze 28–31°C w czasie 72 godzin w obecności środków przeciwdziałających pienieniu, w trakcie mieszania i napowietrzania podłoża sterylnym powietrzem doprowadzanym w ilości 1,2 części objętościowa na 1 część objętościową podłoża w czasie 1 minuty, oddzieleniu otrzymanego preparatu w postaci biomasy od cieczy pohodowlanej, przemyciu wodą destylowaną w celu odmycia rozpuszczalnych produktów metabolizmu, odwodnieniu acetonem schłodzonym do temperatury 4°C i suszeniu w temperaturze pokojowej w czasie 48 godzin i następnie rozdrobnieniu w młynie udarowym, **według wynalazku** charakteryzuje się tym, że preparat otrzymuje się w drodze hodowli selektanta pleśni *Mucor circinelloides* TB80300A, którego zarodniki hodzi się na podłożu stałym zawierającym w częściach wagowych: agaru 20 części, a nadto 3,66 części namoku kukurydzianego, 1 część zemulgowanej frakcji technicznych kwasów tłuszczowych stanowiącej odpad przy rafinacji oleju rzepakowego (TKT) i 1000 części wody wodociągowej. Hodowlę inokulum selektanta prowadzi się w podłożu ciepłym zawierającym w częściach wagowych: namoku kukurydzianego 36,6 części, wody wodociągowej 1000 części, a nadto 13,5–67,5 części TKT, stosując 1 cm³ zarodników na 100 cm³ podłoża. Hodowlę produkcyjną selektanta prowadzi się na podłożu ciepłym o składzie jak podłoże inokularne, zaszczepionym inokulum użytym w ilości 10% objętościowych w stosunku do objętości podłoża.

Selektant pleśni *Mucor circinelloides* TB80300A otrzymuje się ze szczepu pleśni *Mucor circinelloides* TB wyizolowanego z pancerzy krewetek, który poddaje się aktywacji na wysterylizowanym podłożu stałym o składzie w częściach wagowych: 1 część zemulgowanej TKT, 3,66 części namoku kukurydzianego, 20 części agaru, 1000 części wody destylowanej, w temperaturze 30°C, w czasie 72 godzin, po czym wyrosłe kolonie poddaje się selekcji w drodze hodowli wstrząsanej na wysterylizowanym podłożu ciepłym o składzie w częściach wagowych: 13,5–67,5 części TKT, 36,6 części namoku kukurydzianego, 1000 części wody wodociągowej, o wyjściowym pH = 4,6–5,0 w temperaturze 29–31°C w czasie 24 godzin przy stopniu napełnienia kolb 20% objętościowych i szybkości obrotowej wstrząsarki 220 minut⁻¹, przy czym procedurę aktywowania i selekcji pleśni *Mucor circinelloides* powtarza się 3-krotnie. Otrzymany selektant przechowuje się na podłożu stałym o składzie w częściach wagowych 0,5 części TKT, 20 części agaru, 1000 części brzojki piwowarskiej o stężeniu 8°Be, w temperaturze 4°C.

Sposób wytwarzania estrów kwasów tłuszczowych i alkoholi w reakcji syntezy i alkoholizacji, w obecności nierozpuszczalnego preparatu lipazy *Mucor circinelloides* jako katalizatora enzymatycznego, w środowisku rozpuszczalnika organicznego, według wynalazku, charakteryzuje się tym, że estry wytwarza się z TKT i alkoholu cetylowego, 1,6-heksanodiolu, alkoholu stearylowego, 1-dekanolu, alkoholu izoamyłowego, 2-metylo-1-butanolu, 3,7-dimetylooktanolu lub 1-heksanolu, przy stosunku molowym TKT do alkoholu 1:2, w obecności nierozpuszczalnego preparatu lipazy w postaci grzybni selektanta pleśni *Mucor circinelloides* TB80300A otrzymanego wyżej opisanym sposobem, użytego w ilości 2–4% w stosunku do masy substratów, w środowisku eteru naftowego użytego w nadmiarze 1,4–2,0 w stosunku do masy substratów, w temperaturze 30°C w czasie 24–48 godzin mieszając zawartość reaktora z szybkością 120 minut⁻¹, a po zakończeniu reakcji z mieszaniny reakcyjnej odsącza się części stałe enzymu, odparowuje rozpuszczalnik i izoluje otrzymane estry metodą flash chromatografii.

TKT jest frakcją technicznych kwasów tłuszczowych stanowiącą odpad powstały przy rafinacji oleju rzepakowego, zawierającą, obok nasyconych i nienasyconych wolnych kwasów tłuszczowych, także mono-, di- i triacyloglicerole.

Biokatalizator otrzymywany w procesie hodowli selektanta *Mucor circinelloides* TB80300A na podłożu zawierającym w swym składzie TKT wykazuje wysoką katalityczną aktywność i trwałość w biotransformacji *in vitro* TKT do użytecznych estrów. Otrzymany preparat enzymatyczny może być stosowany kilkadziesiąt razy w procesach wytwarzania estrów. W odróżnieniu do znanych preparatów

immobilizowanych lipaz łatwo ulega całkowitej biodegradacji w środowisku ziemi lub kompostu. Sposobem według wynalazku otrzymuje się estry kwasów tłuszczowych z wydajnością 44–99% mierzona metodą GC i liczoną w stosunku do ilości użytej frakcji TKT, w której stężenie wolnych kwasów tłuszczowych nie przekracza 0,2%.

Estry otrzymane sposobem według wynalazku mogą być wykorzystane do wytwarzania smarów lub uszlachetniania baz smarowniczych.

Sposób według wynalazku ilustrują bliżej podane niżej przykłady.

Przykład 1

W celu otrzymania selektanta pleśni *Mucor circinelloides* TB80300A szczep pleśni *Mucor circinelloides* TB, wyizolowany z pancerzy krewetek, poddano aktywacji na wysterylizowanym termicznie, w czasie 15 minut w temperaturze 121°C, podłożu stałym o składzie w częściach wagowych: 1 część zemulgowanej TKT, 3,66 części namoku kukurydzianego, 20 części agaru, 1000 części wody destylowanej, w temperaturze 30°C, w czasie 72 godzin, po czym wyrosłe kolonie poddano selekcji w drodze hodowli wstrząsanej na wysterylizowanym podłożu ciekłym o składzie w częściach wagowych: 13,5 części TKT, 36,6 części namoku kukurydzianego, 1000 części wody wodociągowej, o wyjściowym pH = 4,6 w temperaturze 29–31°C w czasie 24 godzin przy stopniu napełnienia kolb 20% objętościowych i szybkości obrotowej wstrząsarki 220 minut⁻¹, przy czym procedurę aktywowania i selekcji pleśni *Mucor circinelloides* powtórzono 3-krotnie.

W celu otrzymania grzybni selektanta pleśni *Mucor circinelloides* TB80300A zawierającej preparat lipazy, selektant *Mucor circinelloides* TB80300A, wysiano na wysterylizowane termicznie w czasie 15 minut w temperaturze 121°C podłoże stałe o składzie w częściach wagowych: 1 część TKT, 3,66 części namoku kukurydzianego, 20 części agaru, 1000 części wody wodociągowej i po 3 dniach hodowli w temperaturze 29–31°C zarodniki selektanta zmywano sterylną solą fizjologiczną zawierającą 0,01% Tritonu® X-100 stosując 8 ml soli fizjologicznej na 1 skos. Otrzymaną zawiesinę zarodników szczepiono wysterylizowane w czasie 30 minut w temperaturze 121°C, podłoże hodowlane o składzie w częściach wagowych: 13,5 części TKT, 36,6 części namoku kukurydzianego oraz 1000 części wody wodociągowej, o wyjściowym pH 4,6, stosując 1 cm³ zarodników na 100 cm³ podłoża i prowadzono hodowlę wstrząsaną w temperaturze 28–31°C, w czasie 18 godzin, przy stopniu napełnienia kolb 20% objętościowych i szybkości obrotowej wstrząsarki 220 minut⁻¹. Otrzymanym w wyniku tej hodowli inokulum zaszczerpiono, uprzednio wysterylizowane w czasie 30 minut w temperaturze 121°C, podłoże produkcyjne o objętości 18 litrów wprowadzone do fermentora o objętości całkowitej 24 l, o składzie w częściach wagowych: 13,5 części TKT, 36,6 części namoku kukurydzianego, 1000 części wody wodociągowej, wstępnie napowietrzone sterylnym powietrzem, stosując 10% objętościowych inokulum w stosunku do objętości podłoża. Hodowlę produkcyjną prowadzono w temperaturze 28–31°C w czasie 72 godzin, w obecności środków przeciwdziałających pienieniu, przy mieszaniu z szybkością obrotową 240 minut⁻¹, doprowadzając powietrze w ilości 1,2 część objętościowa na 1 część objętościową podłoża w czasie 1 minuty. Otrzymaną w wyniku hodowli produkcyjnej biomasę *Mucor circinelloides* TB80300A, po oddzieleniu od cieczy pohodowlanej na drodze filtracji, przemywano wodą w celu odmycia rozpuszczalnych produktów metabolizmu, zalewano kolejno 3 porcjami acetonu schłodzonego do temperatury 4°C, stosowanego w ilości 5 części wagowych na 1 część wagową biomasy, mieszając z szybkością obrotową mieszadła 120 minut⁻¹ w reaktorze chemicznym o pojemności 1 dm³ przez 10 minut i następnie ekstrahowano eterem naftowym użytym w ilości jak podczas ekstrakcji acetonem. Odwodnioną i odlipidowaną biomasę suszono na powietrzu w czasie 48 godzin w temperaturze pokojowej i rozdrabniano w młynku udarowym na drobiny o wymiarach 5–10 µm.

Z 1 litra podłoża hodowlanego otrzymano 23,8 g odwodnionego i odlipidowanego mycelium o aktywności lipazy.

Następnie 3 g otrzymanego preparatu immobilizowanej lipazy w postaci odwodnionej grzybni *Mucor circinelloides* TB80300A wprowadzono do reaktora chemicznego o objętości 1 l zawierającego: 36,6 g alkoholu cetylowego, 75 g TKT i 250 g eteru naftowego. Reakcję prowadzono w temperaturze 30°C, przy obrotach mieszadła 150 minut⁻¹ w czasie 48 godzin, po czym mieszaninę reakcyjną sączono na przegrodzie ze spieku ceramicznego G3 w celu oddzielenia biokatalizatora, który po dwukrotnym przemyciu acetonem i eterem naftowym (stosując na każde przemycie 50 ml rozpuszczalnika) używano powtórnie do syntezy estrów. Z przesączu stanowiącego mieszaninę produktów i nie przereagowanych substratów oddestylowywano rozpuszczalnik w temperaturze 65°C, pod ciśnieniem normalnym. Otrzymane estry wydzielano z mieszaniny poreakcyjnej metodą flash chromatografii z wykorzystaniem silikażelu firmy Merck 60A i eluenta heksan: octan etylu (50:1 v/v).

Otrzymano frakcję estrów z wydajnością równą 80%, mierzoną metodą GC i liczoną w stosunku do ilości użytego TKT.

Przykład 2

Lipazę otrzymano postępując jak w przykładzie 1, przy czym hodowlę produkcyjną szczepu prowadzono na podłożu o składzie w częściach wagowych: 67,5 części TKT, 36,6 części namoku kukurydzianego, 1000 części wody wodociągowej.

Z 1 litra podłoża hodowlanego otrzymano 20,8 g odwodnionego i odlipidowanego mycelium o aktywności lipazy.

Do reaktora chemicznego o objętości 1 l, zawierającego: 9,8 g 1,6-heksanodiolu, 75 g TKT, 250 g eteru naftowego, wprowadzono 3 g preparatu immobilizowanej lipazy w postaci otrzymanej uprzednio, odwodnionej grzybni *Mucor circinelloides* TB80300A. Reakcję prowadzono w temperaturze 30°C, przy obrotach mieszadła 150 minut⁻¹ w czasie 24 godzin.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1.

Otrzymano frakcję estrów z wydajnością równą 95%, mierzoną metodą GC i liczoną w stosunku do ilości użytego TKT.

Przykład 3

Preparat lipazy otrzymano postępując jak w przykładzie 1, przy czym hodowlę produkcyjną szczepu prowadzono na podłożu o składzie w częściach wagowych: 27,0 części TKT, 36,6 części namoku kukurydzianego, 1000 części wody wodociągowej.

Z 1 litra podłoża hodowlanego produkcyjnego otrzymano 21,0 g odwodnionego i odlipidowanego mycelium o aktywności lipazy.

Do reaktora chemicznego o objętości 1 l, zawierającego 40,6 g alkoholu stearylowego, 75 g TKT, 250 g eteru naftowego, wprowadzono 3 g preparatu immobilizowanej lipazy w postaci otrzymanej uprzednio, odwodnionej grzybni *Mucor circinelloides* TB80300A. Reakcję prowadzono w temperaturze 30°C, przy obrotach mieszadła 150 minut⁻¹ w czasie 48 godzin.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1.

Otrzymano frakcję estrów z wydajnością równą 90,0%, mierzoną metodą GC i liczoną w stosunku do ilości użytego TKT.

Przykład 4

Preparat lipazy otrzymano postępując w przykładzie 1.

Do reaktora chemicznego o objętości 1 l, zawierającego 23,7 g 1-dekanolu, 75 g TKT, 250 g eteru naftowego, wprowadzono 3 g preparatu immobilizowanej lipazy w postaci otrzymanej uprzednio, odwodnionej grzybni *Mucor circinelloides* TB80300A. Reakcję prowadzono w temperaturze 30°C, przy obrotach mieszadła 150 minut⁻¹ w czasie 24 godzin.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1.

Otrzymano frakcję estrów z wydajnością równą 98,0%, mierzoną metodą GC i liczoną w stosunku do ilości użytego TKT.

Przykład 5

Preparat lipazy otrzymano postępując jak w przykładzie 2.

Do reaktora chemicznego o objętości 1 l, zawierającego 13,1 g alkoholu izoamylowego, 75 g TKT, 250 g eteru naftowego, wprowadzono 3 g preparatu immobilizowanej lipazy w postaci otrzymanej uprzednio, odwodnionej grzybni *Mucor circinelloides* TB80300A. Reakcję prowadzono w temperaturze 30°C, przy obrotach mieszadła 150 minut⁻¹ w czasie 48 godzin.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1.

Otrzymano frakcję estrów z wydajnością równą 65,0%, mierzoną metodą GC i liczoną w stosunku do ilości użytego TKT.

Przykład 6

Preparat lipazy otrzymano postępując jak w przykładzie 2.

Do reaktora chemicznego o objętości 1 l, zawierającego 13,1 g 2-metylo-1-butanolu, 75 g TKT, 250 g eteru naftowego, wprowadzono 3 g preparatu immobilizowanej lipazy w postaci otrzymanej uprzednio, odwodnionej grzybni *Mucor circinelloides* TB80300A. Reakcję prowadzono w temperaturze 30°C, przy obrotach mieszadła 150 minut⁻¹ w czasie 48 godzin.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1.

Otrzymano frakcję estrów z wydajnością równą 70,0%, mierzoną metodą GC i liczoną w stosunku do ilości użytego TKT.

Przykład 7

Preparat lipazy otrzymano postępując jak w przykładzie 3.

Do reaktora chemicznego o objętości 1 l, zawierającego 23,8 g 3,7-dimetylooktanolu, 75 g TKT, 250 g eteru naftowego, wprowadzono 3 g preparatu immobilizowanej lipazy w postaci otrzymanej uprzednio, odwodnionej grzybni *Mucor circinelloides* TB80300A. Reakcję prowadzono w temp. 30°C, przy obrotach mieszadła 150 minut⁻¹ w czasie 48 godzin.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1.

Otrzymano frakcję estrów z wydajnością równą 44,0%, mierzoną metodą GC i liczoną w stosunku do ilości użytego TKT.

Przykład 8

Preparat lipazy otrzymano postępując jak w przykładzie 3.

Przygotowano 800 ml roztworu 1,6-heksanodiolu i TKT w eterze naftowym, zawierającego 9,8 g 1,6-heksanodiolu i 75 g TKT w 250 ml eteru. Przez reaktor kolumnowy o objętości 171 ml i wymiarach: długość 20 cm, średnica 3,3 cm, upakowany odwodnioną grzybnią *Mucor circinelloides* TB80300A w ilości 25 g przepuszczano przygotowany uprzednio roztwór reagentów z szybkością 1 ml/minutę, w temperaturze 30°C przez 36 godzin. Produkty reakcji odbierano w górnej części kolumny z zastosowaniem recyrkulacji podawanego substratu.

Otrzymano frakcję estrów z wydajnością równą 99,0%, mierzoną metodą GC i liczoną w stosunku do ilości użytego TKT.

Przykład 9

Preparat lipazy otrzymano postępując jak w przykładzie 3.

Przygotowano 800 ml roztworu alkoholu stearylowego i TKT w eterze naftowym, zawierającego 40,6 g alkoholu stearylowego i 75 g TKT w 250 ml eteru. Przez reaktor kolumnowy o objętości 171 ml i wymiarach: długość 20 cm, średnica 3,3 cm, upakowany odwodnioną grzybnią *Mucor circinelloides* TB80300A w ilości 25 g przepuszczano przygotowany uprzednio roztwór reagentów z szybkością 1 ml/minutę, w temperaturze 30°C przez 36 godzin. Produkty reakcji odbierano w górnej części kolumny z zastosowaniem recyrkulacji podawanego substratu.

Otrzymano frakcję estrów z wydajnością równą 99,0%, mierzoną metodą GC i liczoną w stosunku do ilości użytego TKT.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania nierozpuszczalnego preparatu lipazy *Mucor circinelloides* w drodze hodowli pleśni *Mucor circinelloides*, polegający na hodowli zarodników pleśni na wysterylizowanym, stałym podłożu zawierającym agar w temperaturze 29–31°C w czasie 3–5 dni, następnie zmyciu wyhodowanych zarodników sterylną solą fizjologiczną z dodatkiem surfaktanta, zaszczepieniu zawiesiną zarodników wysterylizowanego, ciekłego podłoża aktywującego zawierającego namok kukurydziany i wodę wodociągową, o wyjściowym pH 4,6–5,0 i prowadzeniu w tym podłożu hodowli wstrząsanej inokulum w temperaturze 28–31°C w czasie 18 godzin przy stopniu napełnienia kolb 20% i szybkości obrotowej wstrząsarki 220 minut⁻¹, następnie zaszczepieniu otrzymanym inokulum wysterylizowanego i wstępnie napowietrzonego sterylnym powietrzem, ciekłego podłoża produkcyjnego zawierającego namok kukurydziany i wodę wodociągową i prowadzeniu hodowli produkcyjnej w temperaturze 28–31°C w czasie 72 godzin w obecności środków przeciwdziałających pienieniu, w trakcie mieszania i napowietrzania podłoża sterylnym powietrzem doprowadzanym w ilości 1,2 części objętościowa na 1 część objętościową podłoża w czasie 1 minuty, oddzieleniu otrzymanego preparatu w postaci biomasy od cieczy pohodowlanej, przemyciu wodą destylowaną w celu odmycia rozpuszczalnych produktów metabolizmu, odwodnieniu acetonem schłodzonym do temperatury 4°C i suszeniu w temperaturze pokojowej w czasie 48 godzin i następnie rozdrobnieniu w młynie udarowym, **znamienny tym**, że preparat otrzymuje się w drodze hodowli selektanta pleśni *Mucor circinelloides* TB80300A, którego zarodniki hodzi się na podłożu stałym zawierającym w częściach wagowych: agaru 20 części, a nadto 3,66 części namoku kukurydzianego, 1 część zemulgowanej frakcji technicznych kwasów tłuszczowych stanowiącej odpad w procesie rafinacji oleju rzepakowego i 1000 części wody wodociągowej, hodowlę inokulum selektanta prowadzi się w podłożu ciekłym zawierającym w czę-

- ściach wagowych: namoku kukurydzianego 36,6 części, wody wodociągowej 1000 części, a nadto 13,5–67,5 części frakcji technicznych kwasów tłuszczowych stanowiącej odpad przy rafinacji oleju rzepakowego, stosując 1 cm³ zarodników na 100 cm³ podłoża, zaś hodowlę produkcyjną selektanta prowadzi się na podłożu ciekłym o składzie jak podłoże inokularne, zaszczipionym inokulum użytym w ilości 10% objętościowych w stosunku do objętości podłoża.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że selektant pleśni *Mucor circinelloides* TB80300A otrzymuje się ze szczepu pleśni *Mucor circinelloides* TB wyizolowanego z pancerzy krewetek, który poddaje się aktywacji na wysterylizowanym podłożu stałym o składzie w częściach wagowych: 1 część zemulgowanej frakcji technicznych kwasów tłuszczowych stanowiącej odpad przy rafinacji oleju rzepakowego, 3,66 części namoku kukurydzianego, 20 części agaru, 1000 części wody destylowanej, w temperaturze 30°C, w czasie 72 godzin, po czym wyrosłe kolonie poddaje się selekcji w drodze hodowli wstrząsanej na wysterylizowanym podłożu ciekłym o składzie w częściach wagowych: 13,5–67,5 części frakcji technicznych kwasów tłuszczowych stanowiącej odpad przy rafinacji oleju rzepakowego, 36,6 części namoku kukurydzianego, 1000 części wody wodociągowej, o wyjściowym pH = 4,6–5,0 w temperaturze 29–31°C w czasie 24 godzin przy stopniu napełnienia kolb 20% objętościowych i szybkości obrotowej wstrząsarki 220 minut⁻¹, przy czym procedurę aktywowania i selekcji pleśni *Mucor circinelloides* powtarza się 3-krotnie, a otrzymany selektant przechowuje się na podłożu stałym o składzie w częściach wagowych 0,5 części frakcji technicznych kwasów tłuszczowych stanowiącej odpad przy rafinacji oleju rzepakowego, 20 części agaru, 1000 części brzeczki piwowarskiej o stężeniu 8°Be, w temperaturze 4°C.
 3. Sposób wytwarzania estrów kwasów tłuszczowych i alkoholi w reakcji syntezy alkoholizy, w obecności nierozpuszczalnego preparatu lipazy *Mucor circinelloides* jako katalizatora enzymatycznego, w środowisku rozpuszczalnika organicznego, **znamienny tym**, że estry wytwarza się z frakcji technicznych kwasów tłuszczowych stanowiącej odpad przy rafinacji oleju rzepakowego oraz alkoholu cetylowego, 1,6-heksanodiolu, alkoholu stearylowego, 1-dekanolu, alkoholu izoamyłowego, 2-metylo-1-butanolu, 3,7-dimetylooktanolu lub 1-heksanolu, przy stosunku molowym frakcji technicznych kwasów tłuszczowych do alkoholu 1:2, w obecności nierozpuszczalnego preparatu lipazy w postaci grzybni selektanta pleśni *Mucor circinelloides* TB80300A otrzymanego sposobem określonym w zastrz. 1, użytego w ilości 2–4% w stosunku do masy substratów, w środowisku eteru naftowego użytego w nadmiarze 1,4–2 w stosunku do masy substratów, w temperaturze 30°C w czasie 24–48 godzin mieszając zawartość reaktora z szybkością 120 minut⁻¹, a po zakończeniu reakcji z mieszaniny reakcyjnej odsącza się części stałe enzymu, odparowuje rozpuszczalnik i izoluje otrzymane estry metodą flash chromatografii.

