

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **236589**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **420446**

(22) Data zgłoszenia: **10.02.2017**

(51) Int.Cl.

C12N 9/96 (2006.01)

A01N 43/48 (2006.01)

A01N 43/80 (2006.01)

C07D 233/60 (2006.01)

C07D 275/06 (2006.01)

(54) **Zastosowania optycznie czynnych sacharynianów imidazoliowych w enzymologii**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

04.12.2017 BUP 25/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

25.01.2021 WUP 02/21

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

JOANNA FEDER-KUBIS, Wrocław, PL

JOANNA BRYJAK, Stary Śleszów, PL

URSZULA ŚWIERCZEK, Koskowice, PL

ZOFIA HRYDZIUSZKO, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 236589 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są zastosowania optycznie czynnych sacharynianów imidazoliowych, zawierających pochodną chiralnego (1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentolu i łańcuch alkilowy w enzymologii w szczególności do aktywacji i stabilizacji enzymów z grupy oksydoreduktaz i hydrolaz oraz jako środka biobójczego.

Z polskiego zgłoszenia patentowego nr P412243 A1 znane jest zastosowanie chiralnych chlorowatych cieczy jonowych zawierających pochodną (1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentolu do wytwarzania środka lub preparatu do leczenia lub profilaktyki infekcji grzybiczych w szczególności wywołanych przez *Candida albicans*. Do badań nad aktywnością przeciugrzybiczną w zgłoszeniu wybrano trzy szczepy *C. albicans*: (i) *C. albicans* SC5314 (izolat kliniczny), (ii) *C. albicans* CAF2-1 (Δ ura3::imm434/URA3), (iii) *C. albicans* CAF4-2 (Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434). Czyste hodowle badanych szczepów utrzymywano do doświadczeń na podłożu stałym YPD w 4°C i przesiewano co 2 tygodnie.

W literaturze światowej znane są doniesienia dotyczące zastosowania soli jonowych o różnej strukturze kationowo-anionowej do aktywacji i stabilizacji enzymów, np.: wzrost aktywności i stabilności lakazy z *Cerrena unicolor* z wykorzystaniem bis(trifluorometylosulfonylo)imidków amoniowych, imidazoliowych oraz pirydyniowych z komponentem terpenowym – aktywny składnik: J. Feder-Kubis, J. Bryjak "Laccase activity and stability in the presence of menthol-based ionic liquids" *Acta Biochim. Pol.*, 60, 741–745 (2013). Innym doniesieniem jest zgłoszenie patentowe nr P416691 A1, w którym ujawniono chiralne cieczy jonowe z podstawnikiem alkoholu monocyklicznego terpenowego oraz z anionem salicylanowym, wykazujące zastosowanie do aktywacji i stabilizacji lipazy oraz o właściwościach przeciwmikrobiologicznych, których wytwarzanie polega na tym, że odpowiedni chiralny prekursor, wybrany z grupy chlorków 3-alkilo-1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentoksymetylo]imidazoliowych, poddaje się reakcji wymiany z salicylanem sodu w stosunku bliskim równomolowemu, korzystnie równym od 0,95 do 1,85, w temperaturze od 273 do 373 K, w obecności rozpuszczalnika organicznego lub w wodzie.

Z doniesienia konferencyjnego pt. „Chiralne cieczy jonowe zawierające słodki anion aromatyczny” zaprezentowanego na VIII Sympozjum Czwartorzędowe Sole Amoniowe i Obszary ich Zastosowania Poznań 1–3 lipca, 2013 roku (książka streszczeń, s. 77) znane są chiralne cieczy jonowe zawierające kation alkilimidazoliowy z komponentem (1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentolu jednocześnie z anionem sacharynianowym, o wzorze ogólnym: [ImRMentol]⁺Sach⁻, w którym R oznacza grupę alkilową C_nH_{2n+1}, gdzie n wynosi 1–12.

Natomiast w polskim zgłoszeniu patentowym nr P408755 A1 opisana została powyższa grupa słodkich cieczy jonowych zawierających komponent (1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentolu oraz organiczny anion sacharynianowy {o wzorze ogólnym [ImRMentol]⁺Sach⁻, w którym R oznacza grupę alkilową C_nH_{2n+1}, gdzie n wynosi 1–12} jako materiały luminescencyjne. Właściwości luminescencyjne sprawdzono wykonując pomiary widm emisji, wzbudzenia oraz wyznaczenie wydajności kwantowej badanej substancji.

Istotą wynalazku jest zastosowanie optycznie czynnych sacharynianów imidazoliowych zawierających pochodną optycznie czynnego (1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentolu, o wzorze ogólnym [R-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻, w którym R oznacza grupę alkilową C_nH_{2n+1}, gdzie n wynosi 1, 3, 6, 9, 12 oraz 14, do aktywacji i stabilizacji enzymów z grupy oksydoreduktaz i hydrolaz, w szczególności lakazy, lipazy lub trypsyny w roztworach białkowych.

Korzystnie do aktywacji lakazy stosuje się optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe określone powyżej o długości łańcucha alkilowego od metylowego do nonyloвого w stężeniu 2,5 mM oraz optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe zawierające łańcuch alkilowy od metylowego do heksyloвого w stężeniu 8,0–51,1 mM.

Korzystnie do aktywacji lipazy stosuje się optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe określone powyżej o długości łańcucha alkilowego od propylowego do dodecyloвого w stężeniu 2,5 mM oraz optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe zawierające łańcuch alkilowy od metylowego do nonyloвого w stężeniu 5,8–55,9 mM.

Korzystnie do aktywacji trypsyny stosuje się optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe określone powyżej o długości łańcucha alkilowego od heksyloвого do tetradecyloвого w stężeniu 0,5 mM.

Korzystnie do stabilizacji lipazy stosuje się optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe określone powyżej o długości łańcucha alkilowego od metylowego do tetradecyloвого w stężeniu 2,5 mM oraz optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe zawierające łańcuch alkilowy od heksyloвого do tetradecyloвого w stężeniu 2,5–7,8 mM.

Korzystnie do stabilizacji trypsyny stosuje się optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe określone w zastrz. 1 o długości łańcucha alkilowego od metylowego do dodecyłowego w stężeniu 0,5 mM oraz optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe zawierające łańcuch alkilowy od metylowego do tetradecylowego w stężeniu 0,9–50,4 mM.

Istotą wynalazku jest również zastosowanie optycznie czynnych sacharynianów imidazoliowych zawierających pochodną optycznie czynnego (1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentolu o wzorze ogólnym [R-Im-CH₂O-Mentol]⁺Sach⁻, w którym R oznacza grupę alkilową C_nH_{2n+1}, gdzie n wynosi 1, 3, 6, 9, 12 oraz 14 jako środków biobójczych, obejmujących działanie bakterio- i grzybobójcze oraz bakterio- i grzybostatyczne.

Korzystnie jako środek grzybobójczy stosuje się optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe określone powyżej o długości łańcucha alkilowego od metylowego do nonylowego w stężeniu 2,5–55,9 mM.

Korzystnie jako środek bakteriobójczy stosuje się optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe określone powyżej o długości łańcucha alkilowego od metylowego do heksylowego w stężeniu 6,8–55,9 mM.

Korzystnie jako środek bakterio- i grzybostatyczny stosuje się optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe określone powyżej w stężeniu 0,5 mM.

Optycznie czynne sole imidazoliowe, zawierające pochodną chiralnego (1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentolu i łańcuch alkilowy, stosowane w rozwiązaniu to związki zawierające w anionie komponent popularnego słodzika: sacharyny – substancji powszechnie stosowanej w przemyśle spożywczym [U. Świerczek, A. Borowiecka, J. Feder-Kubis „Struktura, właściwości i przykłady zastosowań syntetycznych substancji słodzących” Żywność. Nauka. Technologia. Jakość 4, 15–25 (2016)]. Optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe to związki silnie hydrofobowe o gęstościach mieszczących się w zakresie 1,21±1,09 [g/cm³]. Lepkość kinematyczna badanych soli jonowych zawiera się w zakresie 512÷689 [mm²/s]. Omawiane optycznie czynne pochodne sacharyny mogą efektywnie konwertować promieniowanie ultrafioletowe. Wydajności kwantowe wyznaczone dla chiralnych soli sacharynianowych wahają się w zakresie od 20 do 40% w zależności od badanej substancji.

Stężenie zastosowanych soli [R-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻ w roztworach użytkowych zostało wyznaczone poprzez pomiar spektrofotometryczny przy 270 nm (sygnał pochodzący od anionu sacharynianowego) i obliczone na podstawie krzywej standardowej wykonanej dla sacharynianu sodu.

Optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe, przedstawione wzorem [R-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻, według wynalazku, wykazują zdolność do modulacji reaktywności enzymów. Cechę tę sprawdzono określając wpływ otrzymanych sacharynianów imidazoliowych na aktywność oraz stabilność lakazy z *Cerrena unicolor*, lipazy z *Pseudomonas cepacia* oraz trypsyny z trzustki bydłowej podczas inkubacji z roztworem użytkowym o danym stężeniu sacharynianu imidazoliowego. Aktywność lakazy wyznaczono w roztworze użytkowym dla gwajakolu, trypsyny w roztworze użytkowym dla BAPNA (α-N-benzoilo-L-arginylo-4-nitroanilidu) jako substratu poprzez pomiar spektrofotometryczny, a dla lipazy w reakcji hydrolizy tributyriny, przez miareczkowanie roztworem NaOH. Aktywność enzymu w poszczególnych roztworach sacharynianów imidazoliowych była liczona jako aktywność procentowa względem próby kontrolnej, czyli buforu nie zawierającego soli imidazoliowej, przyjętej jako 100% aktywności. Stabilność enzymów w obecności sacharynianu imidazoliowego wyznaczono przez pomiary aktywności w trakcie 6-dniowej inkubacji w 30°C. Wpływ soli imidazoliowej na stabilność enzymu liczono dla 6 dnia inkubacji względem próby kontrolnej, czyli enzymu inkubowanego w buforze nie zawierającym soli imidazoliowej, przyjętej jako 100% stabilności.

Optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe, przedstawione wzorem [R-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻, według wynalazku, wykazują właściwości biobójcze o szerokim spektrum działania. Cechę tę sprawdzono poprzez wykonanie posiewu mikrobiologicznego mieszanin cieczy użytkowej i enzymu lub enzymu w buforze bez soli imidazoliowej, jako próbie kontrolnej, na standardowych pożywkach dla bakterii oraz grzybów po 6-dniowej inkubacji w 30°C w warunkach niesterylnych. Aktywność biostatyczną i biobójczą roztworów soli imidazoliowych wobec kolonii grzybowych i bakteryjnych określano jako procentowy stosunek liczby kolonii mikroorganizmów zliczonych w posiewach z mieszanin cieczy użytkowych i enzymu do liczby kolonii obecnych w posiewie kontrolnym buforu, nie zawierającym soli imidazoliowej.

Dzięki rozwiązaniu według wynalazku uzyskano roztwory użytkowe o różnych stężeniach soli imidazoliowych: 0,5 oraz 2,5 mM o właściwościach bakterio- i grzybostatycznych, które mogą być stosowane jako środowisko do prowadzenia biotransformacji (zwiększają stabilność enzymu oraz znacząco ograniczają wzrost mikroorganizmów) oraz 6,8–55,9 mM o aktywności antymikrobiologicznej, co wskazuje na zastosowanie optycznie czynnych sacharynianów imidazoliowych z łańcuchem alkilowym o długości od metylowego do heksylowego jako dezynfektantów.

Przedmiot wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach realizacji opisujących dodatek sacharynianów imidazoliowych jako modulatorów aktywności i stabilności enzymów oraz środków ograniczających lub hamujących zanieczyszczenie mikrobiologiczne w roztworach białkowych.

Przykład 1

Aktywność lakazy z *Cerrena unicolor*, lipazy z *Pseudomonas cepacia* w roztworach użytkowych zawierających substancję aktywną w stężeniu 2,5 mM oraz trypsyny z trzustki bydłowej w roztworach użytkowych zawierających substancję aktywną w stężeniu 0,5 mM.

Sporządzono 18 roztworów użytkowych: 12 roztworów o stężeniu 2,5 mM i objętości 20 mL poprzez rozpuszczenie w 30°C 21,7 mg sacharynianu 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentoksymetylo]-3-metyloimidazoliowego w 50 mM buforze fosforanowo-cytrynianowym pH 5,2 oraz 50 mM buforze fosforanowym pH 8, 23,1 mg sacharynianu 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentoksymetylo]-3-propyloimidazoliowego w 50 mM buforze fosforanowo-cytrynianowym pH 5,2 oraz 50 mM buforze fosforanowym pH 8, 25,2 mg sacharynianu 3-heksylo-1-(1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentoksymetyloimidazoliowego w 50 mM buforze fosforanowo-cytrynianowym pH 5,2 oraz 50 mM buforze fosforanowym pH 8, 27,3 mg sacharynianu 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentoksymetylo]-3-nonyloimidazoliowego w 50 mM buforze fosforanowo-cytrynianowym pH 5,2 oraz 50 mM buforze fosforanowym pH 8, 29,4 mg sacharynianu 3-dodecylo-1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentoksymetyloimidazoliowego w 50 mM buforze fosforanowo-cytrynianowym pH 5,2 oraz 50 mM buforze fosforanowym pH 8, 30,8 mg sacharynianu 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentoksymetylo]-3-tetradecyloimidazoliowego w 50 mM buforze fosforanowo-cytrynianowym pH 5,2 oraz 50 mM buforze fosforanowym pH 8, a także 6 roztworów o stężeniu 0,5 mM poprzez rozpuszczenie w 30°C 4,3 mg sacharynianu 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentoksymetylo]-3-metyloimidazoliowego w 50 mM buforze boranowym pH 8,0, 4,6 mg sacharynianu 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentoksymetylo]-3-propyloimidazoliowego w 50 mM buforze boranowym pH 8,0, 5 mg sacharynianu 3-heksylo-1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentoksymetyloimidazoliowego w 50 mM buforze boranowym pH 8,0, 5,5 mg sacharynianu 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentoksymetylo]-3-nonyloimidazoliowego w 50 mM buforze boranowym pH 8,0, 5,88 mg sacharynianu 3-dodecylo-1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentoksymetyloimidazoliowego w 50 mM buforze boranowym pH 8,0, oraz 6,2 mg sacharynianu 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentoksymetylo]-3-tetradecyloimidazoliowego w 50 mM buforze boranowym pH 8,0.

Uzyskane roztwory użytkowe wykorzystano do pomiaru aktywności lakazy z *Cerrena unicolor* (pH 5,2) lipazy z *Pseudomonas cepacia* (pH 8) oraz trypsyny z trzustki bydłowej (pH 8). Do 1 mL uzyskanych roztworów użytkowych o pH 5,2 dodano 10 µL 150 mM gwajakolu i 5 µL lakazy (aktywność właściwa 30 U/mg) i oznaczono aktywność enzymatyczną w 30°C poprzez pomiar spektrofotometryczny przy 525 nm. Do 1 mL uzyskanych roztworów użytkowych o pH 8 dodano 50 µL tributyriny i 5 µL lipazy (aktywność właściwa 93 U/mg) i oznaczono aktywność enzymatyczną w 37°C poprzez miareczkowanie powstałego kwasu masłowego 0,01 M alkoholowym roztworem NaOH. Do 1 mL uzyskanych roztworów użytkowych buforu boranowego o pH 8 dodano 5 µL 80 mM BAPNA i 5 µL trypsyny (aktywność właściwa 2 U/mg) i oznaczono aktywność enzymatyczną w 30°C poprzez pomiar spektrofotometryczny przy 405 nm. W Tabeli 1 przedstawiono wyniki wyrażone jako procentowa wartość aktywności w odniesieniu do prób kontrolnych nie zawierających soli imidazoliowych, dla których wartość aktywności oznaczono jako 100.

Tabela 1

Procentowa aktywność lakazy i lipazy w roztworach użytkowych zawierających 2,5 mM optycznie czynnych sacharynianów imidazoliowych oraz procentowa aktywność trypsyny w roztworach użytkowych zawierających 0,5 mM optycznie czynnych sacharynianów imidazoliowych, w odniesieniu do prób kontrolnych (za 100% przyjęto wyniki uzyskane dla roztworów bez soli imidazoliowej).

Optycznie czynny sacharynian imidazoliowy [R-Im-CH ₂ OMentol] ⁺ Sach ⁻	Aktywność lakazy, pH 5,2 [%]	Aktywność lipazy, pH 8,0 [%]	Aktywność trypsyny, pH 8,0 [%]
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(–)-mentoksymetylo]-3-metyloimidazoliowy [CH ₃ -Im-CH ₂ OMentol] ⁺ Sach ⁻	119,4	77,4	99,4

sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-propyloimidazoliowy [C ₃ H ₇ -Im-CH ₂ OMentol] ⁺ Sach ⁻	134,4	102,9	99,7
sacharynian 3-heksylo-1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowy [C ₆ H ₁₃ -Im-CH ₂ OMentol] ⁺ Sach ⁻	126,4	150,3	105,4
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-nonyloimidazoliowy [C ₉ H ₁₉ -Im-CH ₂ OMentol] ⁺ Sach ⁻	116,6	110,7	112,6
sacharynian 3-dodecylo-1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowy [C ₁₂ H ₂₅ -Im-CH ₂ OMentol] ⁺ Sach ⁻	91,7	101,6	112,3
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-tetradecyloimidazoliowy [C ₁₄ H ₂₉ -Im-CH ₂ OMentol] ⁺ Sach ⁻	87,3	79,6	104,5

Dodatek optycznie czynnych sacharynianów imidazoliowych z podstawnikiem alkilowym od metylowego do nonyloowego w stężeniu 2,5 mM w roztworze użytkowym o pH 5,2 powoduje wzrost aktywności lakazy. 2,5 mM stężenie sacharynianu 3-dodecylo-1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowego i sacharynianu 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]-3-tetradecyloimidazoliowego w roztworach użytkowych o pH 5,2 powoduje niewielki spadek aktywności tego enzymu. Korzystne jest stosowanie 2,5 mM stężenia sacharynianów imidazoliowych z podstawnikiem alkilowym od propyloowego do dodecyloowego w roztworach użytkowych o pH 8 do aktywacji lipazy. Sacharynian 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]-3-metyloimidazoliowy oraz sacharynian 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]-3-tetradecyloimidazoliowy w podanym stężeniu powodują niewielki spadek aktywności lipazy. Korzystne jest stosowanie 0,5 mM stężenia sacharynianów imidazoliowych {[R-Im-CH₂O-Mentol]⁺Sach⁻} do stabilizacji trypsyny. 0,5 mM stężenie sacharynianów imidazoliowych z podstawnikiem od heksyloowego do tetradecyloowego powoduje wzrost aktywności tego enzymu.

Przykład 2

Stabilność lakazy z *Cerrena unicolor*, lipazy z *Pseudomonas cepacia* oraz trypsyny z trzustki bydłowej w roztworach użytkowych zawierających substancję aktywną w stężeniu 2,5 mM (dla lakazy i lipazy) oraz 0,5 mM (dla trypsyny) oraz czystość mikrobiologiczna roztworów użytkowych z enzymem po 144 h inkubacji.

Roztwory użytkowe o stężeniu 2,5 mM oraz 0,5 mM uzyskano poprzez rozpuszczenie w 30°C odpowiednich naważek optycznie czynnych sacharynianów imidazoliowych, analogicznie jak w Przykładzie 1, w 50 mM buforze fosforanowo-cytrynianowym pH 5,2, 50 mM buforze fosforanowym pH 8 oraz 50 mM buforze boranowym wykorzystano do oznaczenia stabilności i czystości mikrobiologicznej roztworów enzymatycznych. Do 3 mL uzyskanych roztworów użytkowych o pH 5,2 dodano 100 µL lakazy (aktywność właściwa 170 U/mg), do 3 mL uzyskanych roztworów użytkowych o pH 8 (lipaza) dodano 100 µL lipazy (aktywność właściwa 830 U/mg), a także do 3 mL uzyskanych roztworów użytkowych o pH 8 (trypsyna) dodano 100 µL trypsyny (aktywność właściwa 15 U/mg). Mieszaniny inkubowano przez 144 godziny w 30°C i oznaczano aktywność enzymów w ustalonych odstępach czasowych. Po 6 dniach inkubacji w warunkach niesterylnych, pobierano 100 µL enzymu w przygotowanych roztworach użytkowych o pH 5,2 lub pH 8, rozcieńczano 1, 10, 100, 1000, 10 000 razy sterylnym płynem fizjologicznym i wysiewano 50 µL próbki na standardowych stałych pożywkach odpowiednich do wzrostu bakterii (LB Agar) lub grzybów (Potato Dextrose Agar). Hodowle inkubowano w 30°C, po 2 dniach zliczono liczbę kolonii bakteryjnych, a po 4 dniach liczbę kolonii grzybiczych. W Tabeli 2 przedstawiono wyniki wyrażone jako procentowe wartości badanych parametrów w odniesieniu do prób kontrolnych nie zawierających soli imidazoliowych.

Tabela 2

Procentowa stabilność lakazy, lipazy, trypsyny oraz liczba kolonii bakteryjnych i grzybiczych po 6 dniach inkubacji w 30°C w roztworach użytkowych o pH 5,2 i pH 8 zawierających optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe w stężeniu 2,5 mM oraz 0,5 mM dla trypsyny w odniesieniu do prób kontrolnych (za 100% przyjęto wyniki uzyskane dla roztworów bez soli imidazoliowej).

Optycznie czynny sacharynian imidazoliowy [R-Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	Lakaza (pH 5,2)			Lipaza (pH 8,0)			Trypsyna (pH 8,0)		
	Stabilność enzymu [%]	Liczba kolonii bakteryjnych [%]	Liczba kolonii grzybiczych [%]	Stabilność enzymu [%]	Liczba kolonii bakteryjnych [%]	Liczba kolonii grzybiczych [%]	Stabilność enzymu [%]	Liczba kolonii bakteryjnych [%]	Liczba kolonii grzybiczych [%]
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-metyloimidazoliowy [CH ₃ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	61,7	0,0003	brak	103,4	9,7522	brak	135,7	10,8056	3,2677
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-propyloimidazoliowy [C ₃ H ₇ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	51,9	brak	brak	106,2	1,1900	brak	121,8	7,1988	2,7606
sacharynian 3-heksylo-1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowy [C ₆ H ₁₃ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	65,8	brak	brak	98,6	brak	brak	129,8	brak	brak
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-nonyloimidazoliowy [C ₉ H ₁₉ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	66,4	0,0003	brak	98,8	0,6729	brak	133,5	brak	brak
sacharynian 3-dodecylo-1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowy [C ₁₂ H ₂₅ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	44,5	0,0054	0,0288	106,4	3,2053	0,0066	163,6	0,0063	0,02817
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-tetradecyloimidazoliowy [C ₁₄ H ₂₉ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	75,2	2,2315	0,2304	105,6	9,0452	0,2354	95,5	0,0009	0,0352

Zastosowanie roztworów użytkowych o pH 5,2 o 2,5 mM stężeniu sacharynianów imidazoliowych powoduje spadek stabilności lakazy, ale znacząco ogranicza wzrost mikroorganizmów podczas długoterminowej inkubacji w 30°C. Roztwory użytkowe o pH 8 powodują stabilizację lipazy oraz ograniczają wzrost mikroorganizmów w roztworze enzymatycznym, co sprawia, że sacharynianowe sole imidazoliowe z podstawnikiem alkilowym od metylowego do tetradecylowego mogą być wykorzystywane jako stabilizator podczas długoterminowych biotransformacji z wykorzystaniem lipazy. Zastosowanie roztworów użytkowych sacharynianów imidazoliowych z podstawnikiem alkilowym od metylowego do dodecyloвого o stężeniu 0,5 mM powoduje znaczący wzrost stabilności trypsyny, natomiast obecność sacharynianu 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]-3-tetradecyloimidazoliowego w roztworze, jej nieznaczny spadek w czasie 144 h inkubacji w porównaniu do roztworu, który nie zawierał soli imidazoliowej. Roztwory te ograniczają wzrost mikroorganizmów w roztworze enzymatycznym, co sugeruje na ich właściwości bakterio- i grzybobójcze w przypadku związków: [CH₃-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻, [C₃H₇-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻, [C₁₂H₂₅-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻ oraz [C₁₄H₂₉-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻, a także biobójczych związków zawierających heksylowy {[C₆H₁₃-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻} i nonylowy {[C₉H₁₉-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻} łańcuch alifatyczny, pozwalających zachować sterylność układu. W niespecyficznych testach mikrobiologicznych, czyli przy braku sterylności podczas długoterminowej inkubacji roztworów użytkowych o pH 5,2 i pH 8 oraz 0,5 i 2,5 mM stężeniu sacharynianowych soli

z podstawnikami alkilowym od metylowego do nonylowego, wykazano ich pełną grzybobójczość, co wskazuje na zastosowanie tych związków jako środka przeciugrzybiczego o szerokim spektrum działania już w stężeniu 0,5 mM. W niespecyficznych testach mikrobiologicznych wykazano bakteriostatyczne działanie roztworów użytkowych o pH 5,2 i pH 8 zawierających badane sacharyniany w stężeniu 2,5 mM, a sacharynian 3-heksylo-1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowy {[C₉H₁₃-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻} w tym stężeniu wykazał działanie bakteriobójcze. Sacharynian z łańcuchem alifatycznym zawierającym 6 atomów węgla {[C₆H₁₃-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻} w stężeniu 2,5 mM w roztworach użytkowych o pH 5,2 i pH 8 oraz 0,5 mM o pH 8 może mieć zastosowanie jako dezynfektant o szerokim spektrum działania, a w roztworze użytkowym o pH 8 jako stabilizator lipazy oraz trypsyny podczas długoterminowych biotransformacji.

Przykład 3

Aktywność lakazy z *Cerrena unicolor* i lipazy z *Pseudomonas cepacia* w roztworach użytkowych nasyconych substancjami aktywnymi: [R-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻.

Roztwory użytkowe nasycone sacharynianem 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]-3-metyloimidazoliowym uzyskano inkubując w 30°C przez 72 godziny w 10 mL 50 mM buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 5,2 i w 10 mL 50 mM buforu fosforanowego o pH 8, 250 mg sacharynianu z podstawnikiem metylowym. Roztwory użytkowe nasycone sacharynianem 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]-3-propyloimidazoliowym uzyskano inkubując w 30°C przez 72 godziny w 10 mL 50 mM buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 5,2 i w 10 mL 50 mM buforu fosforanowego o pH 8, 110 mg sacharynianu z podstawnikiem propylowym. Roztwory użytkowe nasycone sacharynianem 3-heksylo-1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowym, sacharynianem 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]-3-nonyloimidazoliowym, sacharynianem 3-dodecylo-1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowym oraz sacharynianem 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]-3-tetradecyloimidazoliowym uzyskano kontaktując w 30°C 50 mM bufor fosforanowo-cytrynianowy o pH 5,2 i 50 mM bufor fosforanowy o pH 8 z sacharynianami z podstawnikami heksylowym, nonylowym, dodecylowym i tetradecylowym w stosunku objętościowym 1:1, całość 5-krotnie intensywnie mieszano w ciągu pierwszej doby i pozostawiono na kolejnych 48 godzin. Po 72 godzinach inkubacji wszystkie otrzymane mieszaniny odwirowano przez 10 min przy 8000 rpm, uzyskując roztwory użytkowe o stężeniach optycznie czynnych sacharynianów imidazoliowych podanych w Tabeli 3.

Tabela 3

Procentowa aktywność lakazy i lipazy w roztworach użytkowych nasyconych optycznie czynnymi sacharynianami imidazoliowymi, [R-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻, w odniesieniu do prób kontrolnych (za 100% przyjęto wyniki uzyskane dla roztworów bez soli imidazoliowej).

Optycznie czynny sacharynian imidazoliowy [R-Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	Lakaza (pH 5,2)		Lipaza (pH 8,0)	
	Stężenie sacharynianu imidazoliowego w roztworze użytkowym [mM]	Aktywność enzymu [%]	Stężenie sacharynianu imidazoliowego w roztworze użytkowym [mM]	Aktywność enzymu [%]
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-metyloimidazoliowy [CH ₃ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	51,1	138,2	55,9	147,4
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-propyloimidazoliowy [C ₃ H ₇ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	22,5	145,8	23,2	155,9
sacharynian 3-heksylo-1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowy [C ₆ H ₁₃ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	8,0	175,4	6,8	167,6
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-nonyloimidazoliowy [C ₉ H ₁₉ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	3,8	97,6	5,8	104,7
sacharynian 3-dodecylo-1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowy [C ₁₂ H ₂₅ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	2,5	94,5	2,5	98,0
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-tetradecyloimidazoliowy [C ₁₄ H ₂₉ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	4,5	78,0	7,8	74,1

Uzyskane roztwory użytkowe o pH 5,2 i pH 8 nasycone optycznie czynnymi sacharynianami imidazoliowymi z łańcuchami alkilowymi od metylowego do dodecyłowego zwiększały aktywność enzymów nawet o 75% w przypadku lakazy i 68% dla lipazy w przypadku sacharynianu 3-heksylo-1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowego {[C₆H₁₃-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻} w stężeniu 8 mM. Sacharynian 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]-3-tetradecyloimidazoliowy {[C₁₄H₂₉-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻} w stężeniu 4,5 mM w roztworze użytkowym o pH 5,2 i 7,8 mM w roztworze użytkowym o pH 8 powoduje niewielki spadek aktywności obu badanych enzymów.

Przykład 4

Stabilność lakazy z *Cerrena unicolor*, lipazy z *Pseudomonas cepacia* i trypsyny z trzustki bydłej w roztworach użytkowych nasyconych substancjami aktywnymi, [R-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻, oraz czystość mikrobiologiczna roztworów użytkowych z enzymem po 144 h inkubacji.

Roztwory użytkowe nasycone sacharynianem 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]-3-metyloimidazoliowym uzyskano inkubując w 30°C przez 72 godziny w 10 mL 50 mM buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 5,2 i w 10 mL 50 mM buforu fosforanowego o pH 8, 250 mg sacharynianu z podstawnikiem metylowym, a także 10 mL 50 mM buforu boranowego o pH 8 z 220 mg sacharynianu z podstawnikiem metylowym. Roztwory użytkowe nasycone sacharynianem 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]-3-propyloimidazoliowym uzyskano inkubując w 30°C przez 72 godziny w 10 mL 50 mM buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 5,2 i w 10 mL 50 mM buforu fosforanowego o pH 8, 110 mg sacharynianu z podstawnikiem propylowym, a także 10 mL 50 mM buforu boranowego o pH 8 z 100 mg sacharynianu z podstawnikiem propylowym. Roztwory użytkowe nasycone sacharynianem 3-heksylo-1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowym, sacharynianem 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]-3-nonyloimidazoliowym, sacharynianem 3-dodecylo-1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowym oraz sacharynianem 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentoksymetylo]-3-tetradecyloimidazoliowym uzyskano kontaktując w 30°C 50 mM bufor fosforanowo-cytrynianowy o pH 5,2, 50 mM bufor fosforanowy o pH 8 oraz 50 mM bufor boranowy o pH 8 z sacharynianami z podstawnikami heksyłowym, nonyłowym, dodecyłowym i tetradecyłowym w stosunku objętościowym 1:1, całość 5-krotnie intensywnie mieszano w ciągu pierwszej doby i pozostawiono na kolejnych 48 godzin. Po 72 godzinach inkubacji wszystkie otrzymane mieszaniny odwirowano przez 10 min przy 8000 rpm, uzyskując roztwory użytkowe o stężeniach sacharynianów imidazoliowych podanych w Tabeli 4.

Tabela 4

Procentowa stabilność lakazy i lipazy po 6 dniach inkubacji w 30°C w roztworach użytkowych o pH 5,2 i pH 8 nasyconych optycznie czynnymi sacharynianami imidazoliowymi, [R-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻, w odniesieniu do prób kontrolnych (za 100% przyjęto wyniki uzyskane dla roztworów bez soli imidazoliowej).

Optycznie czynny sacharynian imidazoliowy [R-Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	Lakaza (pH 5,2)		Lipaza (pH 8,0)		Trypsyna (pH 8,0)	
	Stężenie sacharynianu imidazoliowego w roztworze użytkowym [mM]	Stabilność enzymu [%]	Stężenie sacharynianu imidazoliowego w roztworze użytkowym [mM]	Stabilność enzymu [%]	Stężenie sacharynianu imidazoliowego w roztworze użytkowym [mM]	Stabilność enzymu [%]
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-metyloimidazoliowy [CH ₃ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	51,1	18,0	55,9	22,3	50,4	158,0
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-propyloimidazoliowy [C ₃ H ₇ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	22,5	38,3	23,2	46,2	21,6	113,6
sacharynian 3-heksylo-1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowy [C ₆ H ₁₃ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	8,0	60,5	6,8	102,2	5,1	154,5
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-nonyloimidazoliowy [C ₉ H ₁₉ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	3,8	35,7	5,8	107,5	1,2	211,1

sacharynian 3-dodecylo-1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowy [C ₁₂ H ₂₅ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	2,5	50,4	2,5	108,5	0,5	175,2
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-tetradecyloimidazoliowy [C ₁₄ H ₂₉ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	4,5	77,8	7,8	125,8	0,9	160,7

Do 3 mL każdego z uzyskanych roztworów użytkowych o pH 5,2 dodano 100 µL lakazy (aktywność właściwa 170 U/mg), do 3 mL uzyskanych roztworów użytkowych buforu fosforanowego o pH 8 dodano 100 µL lipazy (aktywność właściwa 830 U/mg), a do 3 mL uzyskanych roztworów użytkowych buforu boranowego pH 8 dodano 100 µL trypsyny (aktywność właściwa 15 U/mg). Mieszaniny inkubowano przez 144 godziny w 30°C i oznaczano aktywność obu enzymów w ustalonych odstępach czasowych. Po 6 dniach inkubacji w warunkach niesterylnych, pobierano 100 µL enzymu w przygotowanych roztworach użytkowych o pH 5,2 lub pH 8, rozcieńczano 1, 10, 100, 1000, 10 000 razy sterylnym płynem fizjologicznym i wysiewano 50 µL próbki na standardowych stałych pożywkach odpowiednich do wzrostu bakterii (LB Agar) lub grzybów (Potato Dextrose Agar). Hodowle inkubowano w 30°C, po 2 dniach zliczono liczbę kolonii bakteryjnych, a po 4 dniach liczbę kolonii grzybiczych. W Tabelach 4 i 5 przedstawiono wyniki wyrażone jako procentowe wartości badanych parametrów w odniesieniu do prób kontrolnych nie zawierających soli imidazoliowych.

Tabela 5

Procentowa liczba kolonii bakteryjnych i grzybiczych po 6 dniach inkubacji w 30°C lakazy i lipazy w roztworach użytkowych o pH 5,2 i pH 8 nasyconych optycznie czynnymi sacharynianami imidazoliowymi, [R-Im-CH₂Omentol]⁺Sach⁻, w odniesieniu do prób kontrolnych (za 100% przyjęto wyniki uzyskane dla roztworów bez soli imidazoliowej).

Optycznie czynny sacharynian imidazoliowy [R-Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	Lakaza (pH 5,2)			Lipaza (pH 8,0)			Trypsyna (pH 8,0)		
	Stężenie sacharynianu imidazoliowego [mM]	Liczba kolonii bakteryjnych [%]	Liczba kolonii grzybiczych [%]	Stężenie sacharynianu imidazoliowego [mM]	Liczba kolonii bakteryjnych [%]	Liczba kolonii grzybiczych [%]	Stężenie sacharynianu imidazoliowego [mM]	Liczba kolonii bakteryjnych [%]	Liczba kolonii grzybiczych [%]
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-metyloimidazoliowy [CH ₃ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	51,1	brak	brak	55,9	brak	brak	50,4	brak	brak
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-propyloimidazoliowy [C ₃ H ₇ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	22,5	brak	brak	23,2	brak	brak	21,6	brak	brak
sacharynian 3-heksylo-1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowy [C ₆ H ₁₃ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	8,0	brak	brak	6,8	brak	brak	5,1	brak	brak
sacharynian 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]-3-nonyloimidazoliowy [C ₉ H ₁₉ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	3,8	0,002	brak	5,8	0,359	brak	1,2	brak	0,025
sacharynian 3-dodecylo-1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-mentoksymetylo]imidazoliowy [C ₁₂ H ₂₅ -Im-CH ₂ Omentol] ⁺ Sach ⁻	2,5	0,018	0,014	2,5	3,003	0,003	0,5	0,029	1,070

sacharynian 1- [(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(–)- mentoksymetylo]-3- tetradecyloimidazo- liowy [C ₁₄ H ₂₉ -Im- CH ₂ OMentol] ⁺ Sach ⁻	4,5	0,291	0,043	7,8	6,097	0,017	0,9	0,005	0,013
---	-----	-------	-------	-----	-------	-------	-----	-------	-------

Uzyskane roztwory użytkowe o pH 5,2 nasycone optycznie czynnymi sacharynianami imidazoliowymi w stężeniach 2,5–51,1 mM powodują spadek stabilności lakazy w przypadku każdego związku {[R-Im-CH₂OMentol]⁺Sach⁻}, co wyklucza ich stosowanie jako stabilizatorów lakazy podczas biotechnologicznych procesów długoterminowych. Sacharynian 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentoksymetylo]-3-metyloimidazoliowy w stężeniu 55,9 mM oraz sacharynian 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentoksymetylo]-3-propyloimidazoliowy w stężeniu 23,2 mM w roztworach użytkowych o pH 8 powodują znaczny spadek stabilności lipazy względem enzymu inkubowanego w roztworze bez soli imidazoliowej. Roztwory użytkowe o pH 8 nasycone optycznie czynnymi sacharynianami imidazoliowymi z podstawnikami alkilowymi od heksylowego do tetradecylowego powodują wzrost stabilności lipazy do 126% po 6 dniach inkubacji w 30°C względem enzymu inkubowanego w tym samym czasie bez dodatku substancji aktywnej, stąd nasycone roztwory użytkowe z powyższymi sacharynianami mogą mieć zastosowanie podczas długoterminowych biotransformacji z wykorzystaniem lipaz. Roztwory użytkowe nasycone optycznie czynnymi sacharynianami imidazoliowymi {[R-Im-CH₂OMentol]⁺Sach⁻} powodują znaczący wzrost stabilności trypsyny. Sacharynian 1-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentoksymetylo]-3-nonyloimidazoliowy powoduje wzrost stabilności trypsyny do 211% w stężeniu 1,2 mM oraz działa bakteriobójczo i grzybobójczo, co wskazuje na jego zastosowanie jako stabilizatora trypsyny podczas biotechnologicznych procesów długoterminowych. W niespecyficznych testach mikrobiologicznych, czyli przy braku sterylności podczas długoterminowej inkubacji roztworów użytkowych o pH 5,2 i pH 8 wykazano pełną bakteriobójczość i grzybobójczość soli imidazoliowych z podstawnikiem alkilowym od metylowego do heksylowego w stężeniach 5,1–55,9 mM, dlatego związki te mogą mieć zastosowanie jako dezynfektanty. Optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe zawierające łańcuch alkilowy 9 {[C₉H₁₉-Im-CH₂OMentol]⁺Sach⁻}, 12 {[C₁₂H₂₅-Im-CH₂OMentol]⁺Sach⁻} i 14 {[C₁₄H₂₉-Im-CH₂OMentol]⁺Sach⁻} węglowy wykazują działanie bakteriostatyczne i grzybobójcze w roztworach użytkowych o pH 5,2 i pH 8, dzięki czemu znacząco ograniczają wzrost mikroorganizmów podczas długoterminowych procesów i mogą być stosowane jako stabilizator lipazy oraz trypsyny o pH 8.

Zastrzeżenia patentowe

1. Zastosowanie optycznie czynnych sacharynianów imidazoliowych zawierających pochodną optycznie czynnego (1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentolu, o wzorze ogólnym [R-Im-CH₂OMentol]⁺Sach⁻, w którym R oznacza grupę alkilową C_nH_{2n+1}, gdzie n wynosi 1, 3, 6, 9, 12 oraz 14 do aktywacji i stabilizacji enzymów z grupy oksydoreduktaz oraz hydrolaz w szczególności lakazy, lipazy lub trypsyny w roztworach białkowych.
2. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że do aktywacji lakazy stosuje się optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe określone w zastrz. 1 o długości łańcucha alkilowego od metylowego do nonylowego w stężeniu 2,5 mM oraz optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe zawierające łańcuch alkilowy od metylowego do heksylowego w stężeniu 8,0–51,1 mM.
3. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że do aktywacji lipazy stosuje się optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe określone w zastrz. 1 o długości łańcucha alkilowego od propylowego do dodecylowego w stężeniu 2,5 mM oraz optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe zawierające łańcuch alkilowy od metylowego do nonylowego w stężeniu 5,8–55,9 mM.
4. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że do aktywacji trypsyny stosuje się optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe określone w zastrz. 1 o długości łańcucha alkilowego od heksylowego do tetradecylowego w stężeniu 0,5 mM.
5. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że do stabilizacji lipazy stosuje się optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe określone w zastrz. 1 o długości łańcucha alkilowego od metylowego do tetradecylowego w stężeniu 2,5 mM oraz optycznie czynne sacharyniany

- imidazoliowe zawierające łańcuch alkilowy od heksylowego do tetradecylowego w stężeniu 2,5–7,8 mM.
6. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że do stabilizacji trypsyny stosuje się optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe określone w zastrz. 1 o długości łańcucha alkilowego od metylowego do dodecyłowego w stężeniu 0,5 mM oraz optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe zawierające łańcuch alkilowy od metylowego do tetradecylowego w stężeniu 0,9–50,4 mM.
 7. Zastosowanie optycznie czynnych sacharynianów imidazoliowych zawierających pochodną optycznie czynnego (1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentolu o wzorze ogólnym $[R\text{-Im-CH}_2\text{OMentol}]^+\text{Sach}^-$, w którym R oznacza grupę alkilową $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$, gdzie n wynosi 1, 3, 6, 9, 12 oraz 14, jako środków biobójczych, obejmujących działanie bakterio- i grzybobójcze oraz bakterio- i grzybostatyczne.
 8. Zastosowanie według zastrz. 7, **znamiennie tym**, że jako środek grzybobójczy stosuje się optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe określone w zastrz. 1 o długości łańcucha alkilowego od metylowego do nonylowego w stężeniu 2,5–55,9 mM.
 9. Zastosowanie według zastrz. 7, **znamiennie tym**, że jako środek bakteriobójczy stosuje się optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe określone w zastrz. 1 o długości łańcucha alkilowego od metylowego do heksylowego w stężeniu 6,8–55,9 mM.
 10. Zastosowanie według zastrz. 7, **znamiennie tym**, że jako środek bakterio- i grzybostatyczny stosuje się optycznie czynne sacharyniany imidazoliowe określone w zastrz. 1 w stężeniu 0,5 mM.

Rysunek

