RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **216489** (13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **393657**

(51) Int.Cl.
C12N 11/14 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **17.01.2011**

(54) **Sposób otrzymywania heterogenicznych biokatalizatorów enzymatycznych przeznaczonych do pracy w środowiskach niewodnych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
30.07.2012 BUP 16/12

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.04.2014 WUP 04/14

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA ŚLĄSKA, Gliwice, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
KATARZYNA SZYMAŃSKA, Rudniki, PL
AGATA CZARDYBON, Mikołów, PL
WOJCIECH PUDŁO, Chorzów, PL
ANDRZEJ JARZĘBSKI, Zabrze, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Urszula Ziółkowska

PL 216489 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania heterogenicznych biokatalizatorów enzymatycznych przeznaczonych do pracy w środowiskach niewodnych, przy wykorzystaniu zjawiska pienienia się białek.

Znane są sposoby unieruchamiania enzymów na powierzchni stałych nośników prowadzące do otrzymania heterogenicznych biokatalizatorów [1, 2] reakcji chemicznych prowadzonych w fazie ciekłej. Wiadomo, że w przypadku układu z nośnikiem hydrofobowym, immobilizację enzymu dokonuje się w obecności niewielkich ilości etanolu [3, 4], lub zwilżony etanolem nośnik przemywa się odpowiednim buforem, dokonując w ten sposób podmiany rozpuszczalnika, a następnie przeprowadza się osadzanie białka [5].

Stwierdzono nieoczekiwanie, że możliwe jest zawieszenie nośnika w pianie uzyskanej w wyniku jego intensywnego wytrząsania w wodnym roztworze enzymu, podczas którego zachodzi unieruchomienie enzymu na powierzchni nośnika.

Sposób według wynalazku polega na tym, że proces immobilizacji enzymu rozcieńczonego w wodnym roztworze prowadzi się przez przetrzymywanie nośnika w pianie nie krócej niż 1 godz., przy czym pianę uzyskuje się w wyniku intensywnego wytrząsania roztworu enzymu z nośnikiem.

Wysoce hydrofobowe materiały porowate, charakteryzujące się tym, że są niezwilżane wodą, wykorzystuje się jako nośniki do unieruchamiania enzymów przeznaczonych do pracy w środowiskach niewodnych. Immobilizacji poddawane są wodne roztwory enzymów, sam proces polega na zawieszeniu uprzednio wysuszonego silnie hydrofobowego nośnika w pianie uzyskanej w wyniku intensywnego wytrząsania roztworu enzymu z nośnikiem.

Wynalazek charakteryzuje się tym, że proces immobilizacji enzymu nie zachodzi w roztworze tylko w pianie, która powstała w wyniku intensywnego wytrząsania nośnika i roztworu enzymu.

Wynalazek pozwala na rezygnację ze stosowania etanolu, w trakcie procesu immobilizowania enzymów na powierzchniach hydrofobowych, co nie jest to bez znaczenia, gdyż etanol najczęściej niekorzystnie wpływa na strukturę enzymu, a przeto jego zdolności katalityczne. Tak więc, wynalazek umożliwia technologicznie prosty i efektywny sposób otrzymywania biokatalizatorów enzymatycznych o wyższej aktywności.

P r z y k ł a d 1

Krzemionkowe mezoporowate pianki komórkowe (MCF) otrzymano metodą opisaną w literaturze [6.7]. Funkcjonalizację powierzchni (hydrofobizację) przeprowadzono używając heksametylodisilazan (HMDS) wykorzystując toluen jako rozpuszczalnik (metodyka opisana w literaturze [6, 7]). Po odparowaniu rozpuszczalnika uzyskiwano nośniki o stopniu pokrycia powierzchni krzemionki 1,5 mmol grup funkcyjnych/g krzemionki.

Do 0,2 g suchego nośnika dodano 8 cm^3 roztworu enzymu otrzymanego przez rozcieńczenie 10 cm^3 preparatu Lipozyme RML w 43 cm^3 0,1 M buforu fosforanowego pH 7. Nośnik z roztworem enzymu intensywnie wytrząsano ciągle przez ok. 2-3 h w temperaturze pokojowej, tak aby powstała piana w której zawieszony jest nośnik. Mieszaninę pozostawiono na 20 h w temperaturze pokojowej intensywnie wytrząsając co kilkadziesiąt minut. Następnie nośnik odfiltrowano na lejku Buchnera przemywając niewielką ilością 0,1 M buforu fosforanowego pH 7. Po wysuszeniu biokatalizatora zbadano jego aktywność w reakcji enancjomerycznej estryfikacji.

Ilość związanego przez nośnik białka, stopień przereagowania substratu oraz selektywność otrzymanego biokatalizatora przedstawiono w Tabeli I.

P r z y k ł a d 2

Krzemionki o multimodalnej strukturze porów (MH) otrzymano metodą opisaną w literaturze [8], a otrzymany monolit rozdrobniono w moździerzu. Funkcjonalizację powierzchni (hydrofobizację) przeprowadzono używając heksametylodisilazan (HMDS) wykorzystując toluen jako rozpuszczalnik (metodyka opisana w literaturze [6, 7]). Po odparowaniu rozpuszczalnika uzyskiwano nośniki o stopniu pokrycia powierzchni krzemionki 1,5 mmol grup funkcyjnych/g krzemionki.

Do 0,2 g suchego nośnika dodano 8 cm^3 roztworu enzymu otrzymanego przez rozcieńczenie 10 cm^3 preparatu Lipozyme RML w 43 cm^3 0,1 M buforu fosforanowego pH 7. Nośnik z roztworem enzymu intensywnie wytrząsano ciągle przez ok. 2-3 h w temperaturze pokojowej, tak aby powstała piana w której zawieszony jest nośnik. Mieszaninę pozostawiono na 20 h w temperaturze pokojowej intensywnie wytrząsając co kilkadziesiąt minut. Następnie nośnik odfiltrowano na lejku Buchnera

przemywając niewielką ilością 0,1 M buforu fosforanowego pH 7. Po wysuszeniu biokatalizatora zbadano jego aktywność w reakcji enancjomerycznej estryfikacji.

Ilość związanego przez nośnik białka, stopień przereagowania substratu oraz selektywność otrzymanego biokatalizatora przedstawiono w Tabeli I.

T a b e l a 1

Nośnik	Funkcjonalizacja krzemionki [mmol/g]	Białko związane [mg/g nośnika]	Stopień przereagowania substratu po 4 h (α)[%]	Nadmiar enancjomeryczny (ee_s) [%]
MCF	1,5/HMDS	10,3	50	28
MH	1,5/HMDS	7,2	22	36

[1] A. Wiseman, *Handbook of Enzyme Biotechnology*. New York (**1985**)

[2] J. Bryjak, *Wiadomości Chemiczne* 58 (**2004**) 691

[3] R.M. Blanco, P. Terreros, N. Muñoz. E. Serra, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 47 (**2007**) 13

[4] M. H. Sörensen. J.B.S. Ng, L. Bergström, P.C.A. Alberius, *Journal of Colloid and Interface Science* 343 (**2010**) 359

[5] Y. Li, F Gao, W. Wei, .J.-B. Qu, G.-H. Ma, W.-Q. Zhou, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 66 (**2010**)182

[6] K. Szymańska, J. Bryjak, J. Mrowiec-Białoń. A.B. Jarzębski, *Microporous and Mesoporous Materials* 99 (**2007**) 167

[7] A.B. Jarzębski, K. Szymańska, J. Bryjak, J. Mrowiec-Białoń. *Catalysis Today* 124 (**2007**) 2

[8] W. Pudło, W. Gawlik, J. Mrowiec-Białoń, T. Buczek, J.J. Malinowski, A.B. Jarzębski, Inż. *Chem. Proc*. 27 (**2006**) 177

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania heterogenicznych biokatalizatorów enzymatycznych przeznaczonych do pracy w środowiskach niewodnych z nośnikami o wysoce hydrofobowej powierzchni polegający na immobilizacji enzymu, **znamienny tym**, że proces immobilizacji enzymu rozcieńczonego w wodnym roztworze prowadzi się przez przetrzymywanie nośnika w pianie nie krócej niż 1 godz., przy czym pianę uzyskuje się w wyniku intensywnego wytrząsania roztworu enzymu z nośnikiem.

Departament Wydawnictw UPRP
Cena 2,46 zł (w tym 23% VAT)