

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

94936

Patent dodatkowy
do patentu —

Zgłoszono: 27.03.75 (P. 179127)

Pierwszeństwo: 27.03.74
Stany Zjednoczone Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 13.03.76

Opis patentowy opublikowano: 31.12.1977

MKP

C12k 1/08

C07g 7/02

Int. Cl².

C12K 1/08

C07G 7/02

Twórca wynalazku: —

Uprawniony z patentu: Pfizer Inc.,
Nowy Jork (Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób unieruchomiania komórek drobnoustrojów

Przedmiotem wynalazku jest sposób unieruchomiania komórek drobnoustrojów.

Enzymy z ich znacznym stopniem specyficzności są znacznie lepsze niż konwencjonalne katalizatory w wielu przemianach chemicznych. Jednak do niedawna ich zastosowanie było w znacznym stopniu ograniczone ze względu na takie czynniki, jak wysokie koszty ich izolowania, tendencja do nietrwałości po usunięciu ich ze środowiska całej komórki oraz dostępność ich jedynie w postaci rozpuszczalnej.

Unieruchomienie enzymów przez przyłączenie ich lub zatrzymanie w stałym materiale nośnikowym pomogło w rozwiązaniu niektórych z tych trudności i spowodowało, że zastosowanie enzymów stało się bardziej ekonomiczne. W literaturze pojawiły się artykuły, dotyczące różnych metod fizycznych i chemicznych, stosowanych do unieruchomiania enzymów, na przykład Immobilized Enzymes — O.R. Zaborsky (CRC Press. 1973).

Stosowano również unieruchomianie całej komórki jako takiej, aby uniknąć konieczności izolowania enzymu i rozwiązać problem stabilności. Jednak do chwili obecnej takie unieruchomianie było ograniczone jedynie do metod fizycznych. Typowymi przykładami są adsorpcja komórek *Streptomyces phasochromogenes* zawierających aktywną izomerazę glukozową na zregenerowanym kolagenie skóry (Biotech. Bioengr., XV, str. 565 /1973/) oraz zatrzymanie na żelu komórek grzybów, zawierających enzym hydroksylazy, w celu konwersji związku S do kortyzolu (Scientific American, Mar. 1971, str. 30). Takie metody unieruchomiania nie pozwalają uniknąć dezasocjacji komórek z środowiska nośnikowego. Charakter sił wiążących jest jednak w tym przypadku taki, że warunki reakcji muszą być w znacznym stopniu ograniczone, aby zapobiec lub zminimalizować dezasocjację oraz towarzyszące jej zmniejszenie aktywności enzymatycznej i ewentualnie zanieczyszczenie strumienia reagentów.

Stwierdzono, że komórki drobnoustrojów można unieruchomić na sposób trwalszy na drodze chemicznego kowalentnego związania komórek z nierozpuszczalną w wodzie, rozdrobioną polimerową matrycą. Wiązanie chemiczne może być uzyskane albo z uprzednio otrzymanym polimerem, albo z reaktywnym monomerem przed jego polimeryzacją. Dalsza obróbka komórek za pomocą wielofunkcyjnego środka sieciującego albo przed, albo po związaniu, zmniejsza znacznie straty enzymu z komórek.

Sposób unieruchomienia komórek drobnoustrojowych przez poddanie ich reakcji z wiążącymi ugrupowaniami polimeru polega na wytworzeniu wiązań kowalentnych z nierozpuszczalną w wodzie rozdrobnioną matrycą polimerową, co doprowadza do otrzymania kompozycji, zawierającej komórki drobnoustrojów, kowalennie związane z nierozpuszczalną w wodzie rozdrobnioną matrycą, którą stanowi polimer.

W praktycznej realizacji sposobu według wynalazku nienaruszone komórki drobnoustrojów wiąże się chemicznie z nierozpuszczalnym w wodzie, rozdrobnionym polimerem poprzez grupy reaktywne, występujące w polimerze. O ile chemiczne wiązanie kowalennie wyodrębnionych enzymów z polimerem jest powszechnie stosowane, to fakt, że całe komórki jako takie, będące źródłem enzymów, o wiele rzędów przekraczające je wymiarami, można również w efektywny sposób unieruchomić przez wiązanie kowalenne, jest stwierdzeniem zaskakującym. Takie wiązania często powstają w wyniku reakcji grup aminowych komórki z reaktywnymi podstawnikami w polimerze. Ponadto, w komórce znajdują się inne grupy, takie jak hydroksylowe i sulfonowe, które mogą również odgrywać rolę w mechanizmie wiążącym. Jest to prawda, ponieważ reaktywne wobec grup aminowych podstawniki polimeru, takie jak na przykład ugrupowania epoksydowe, halogenokarbonylowe i halogenometylokarbonylowe, są również reaktywne w odniesieniu do grup hydroksylowej i sulfohydrylowej, występujących w komórkach.

Wiązanie może powstać przed lub po wytworzeniu polimeru. W pierwszym przypadku komórki kontaktuje się z dającym się polimeryzować monomerem, posiadającym nienasycone wiązanie typu etylenowego i posiadającym grupę reaktywną, a następnie związany z komórką monomer polimeryzuje się lub kopolimeryzuje w obecności monomeru sieciującego i układu inicjującego. W drugim przypadku komórki kontaktuje się bezpośrednio z dowolnym, odpowiednim do tego celu polimerem, zawierającym reaktywne grupy. Dotyczy to zarówno polimerów naturalnych, jak i syntetycznych polimerów organicznych.

Dające się polimeryzować nienasycone monomery, zawierające wiązanie typu etylenowego oraz wyprowadzone z nich polimery, nadające się do wykorzystania w sposobie według wynalazku zarówno metodą wiązania przed polimeryzacją, jak i po polimeryzacji, określone są wzorem 1, w którym R_1 oznacza atom wodoru lub chloru albo grupę metylową, zaś W oznacza grupę o wzorze 2, 3, 4 lub 5. We wzorach tych R_2 oznacza atom chlorowca, grupę azydową, grupę 2,3-epoksypropoksy, grupę 2,3-epitiopropoksy, grupę N-/2,3-epoksypropylo-/aminową, grupę N-/p-dwuazoniochloro-/fenylo-/aminową, grupę akryloiloksy, niższą grupę alkoksylkarbonyloksy lub grupę benzenosulfonyloksy, X oznacza atom tlenu lub grupę NR_3 , w której R_3 oznacza atom wodoru lub grupę alkilową, zawierającą 1–6 atomów węgla, Y oznacza ugrupowanie alkilenowe, zawierające 2 lub 3 atomy węgla, n oznacza liczbę całkowitą, wynoszącą 1 lub 2, Z oznacza grupę chlorowcoacetylową, 2-/4,6-dwuchloro-/s-triazynylową, p-toluenosulfonylową, p-/chlorowcometylo-/benzoilową lub grupę cyjanową, zaś $X' = X$ z tym, że jeśli X oznacza grupę p-toluenosulfonylową, wówczas X' oznacza atom tlenu.

Do wiązania najkorzystniejsze są monomery i polimery, zawierające grupy epoksydowe, chlorowcokarbonylowe i chlorowcometylokarbonylowe. Szczególnie korzystne są te polimery, które zawierają reaktywne monomery metakrylanu 2,3-epoksypropylu (metakrylan glicydylu), metakrylan 2,3-epitiopropylu, chlorek metakryloilu oraz metakrylan bromoacetylohydroksyetylu.

W przypadku monomerów i polimerów, zawierających niereaktywne grupy funkcyjne, jak na przykład w przypadku, gdy R_2 oznacza grupę hydroksylową lub Z oznacza atom wodoru w podanym wyżej monomerze o wzorze 1, wówczas takie grupy funkcyjne można przeprowadzić znanymi metodami w podstawniki reaktywne. Operacja ta wymaga często zastosowania wielofunkcyjnych reagentów o małym ciężarze cząsteczkowym.

I tak, gdy R_2 we wzorze 1 oznacza grupę hydroksylową, wówczas karboksylowe grupy monomeru lub polimeru można uaktywnić w reakcji z odpowiednim reagentem, uaktywniającym grupy karboksylowe, takim jak karbodwuimid, na przykład dwucykloheksylokarbodwuimid lub etylomorfolinokarbodwuimid. Z równym powodzeniem użyć można 3'-sulfonian N-etylo-5-fenyloizoksazoliowy (reagent K. Woodwarda), ketoniminy, takie jak pięciometylenoketenocykloheksyloimina, estry acetylenowe, na przykład etoksyacetylen, sześcioklorowocyklotrójfosforotriazyny, N-hydroksyftalimid lub N-hydroksysukcynimid oraz inne reagenty, stosowane do tworzenia wiązań peptydowych.

Gdy Z we wzorze 1 oznacza atom wodoru, wówczas grupy hydroksylowe monomeru lub polimeru można w podobny sposób uaktywnić znanymi metodami przy użyciu związków o wzorze chlorowiec-Z, w którym Z oznacza grupę chlorowcoacetylową, grupę 2-/4,6-dwuchloro-/s-triazynylową, grupę p-toluenosulfonylową, grupę p-/chlorowcometylo-/benzoilową lub grupę cyjanową, zwłaszcza bromku bromoacetylu lub bromocyjanu.

Sposób unieruchomienia znajduje zastosowanie w odniesieniu do komórek drobnoustrojów, takich jak bakterie, drożdże, promienioowce i grzyby. Korzystnymi komórkami są komórki, w których pierwotnymi układami enzymowymi są oksydoreduktazy, szczególnie takie, jak oksydazy glukozowe, nie wymagające rozpuszczalnych kofaktorów, hydrolazy, jak na przykład α , β -amylazy i peptydazy, a szczególnie acylazy penicylinowe,

liazy, korzystnie te, które powodują rozrywanie wiązań węgiel-tlen, a zwłaszcza takie, jak amonioliza fenyloalaninowa i amonioliza asparaginianowa, które są związane z rozrywaniem wiązań węgiel-azot oraz izomerazy, takie jak racemazy, epimerazy, cis-trans izomerazy, a zwłaszcza izomeraza glukozowa.

Korzystnymi rodzajami bakterii są: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Escherichia*, *Aerobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Proteus*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Streptomyces* i *Corynebacterium*. Korzystne rodzaje grzybów i drożdży obejmują: *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Glomerella*, *Rhizopus*, *Saccharomyces*, *Conidiobolus*, *Byssoschlamys*, *Candida*, *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Septoria*, *Coprinus*, *Neurospora*, *Rumucola* i *Trichoderma*. Korzystnym promieniowcem jest rodzaj *Micropolyspora*. Szczególnie korzystne są gatunki *Escherichia coli*, *Bacterium cadaveris*, *Proteus rettgeri*, *Rhodotorula gracilis*, *Penicillium chrysogenum* i *Aspergillus niger*.

Wytworzenie wiązania kowalentnego między komórką i reaktywnym polimerem lub związanie reaktywnego monomeru, a następnie jego polimeryzację lub kopolimeryzację prowadzi się w środowisku wodnym. Chociaż temperatura związania komórki z polimerem lub monomerem lub też temperatura polimeryzacji po związaniu komórki z monomerem może się wahać w szerokim zakresie, to jednak najkorzystniejszy jest zakres 5–50°C, a zwłaszcza 10–30°. Czas potrzebny na wytworzenie wiązania, zależy od charakteru układu i temperatury reakcji, lecz zwykle wynosi 0,5–35 godzin, przy czym korzystny czas wiązania do polimeru wynosi 15–30 godzin, natomiast wiązania komórki z monomerem 1–5 godzin. Polimeryzacja zwykle zachodzi całkowicie w czasie 1–6 godzin. Stosunek wagowy polimeru do komórek (substancja sucha) może się wahać w szerokich granicach, lecz najkorzystniejszy stosunek wynosi 0,1–25, a zwłaszcza 0,5–4.

Jeśli komórki wiąże się z reaktywnym monomerem, to następnie prowadzi się polimeryzację addytywną w środowisku wodnym, z udziałem lub bez, jednego lub większej liczby komonomerów w obecności dwufunkcyjnego monomeru sieciującego oraz układu inicjatora. W tym przypadku można zastosować z łatwością dowolny komonomer, monomer sieciujący lub układ inicjujący spośród zwykle stosowanych w tym typie polimeryzacji, które nie niszczą aktywności enzymatycznej komórki.

Odpowiednimi komonomerami są na przykład kwasy akrylowy, α -chloroakrylowy i metakrylowy oraz estry glicydylowe, niższe estry alkilowe, dwupodstawione przy azocie estry aminoalkilowe, amidy, amidy podstawione niższymi grupami alkilowymi, amidy podstawione grupą metyloową, jednopodstawione przy atomie azotu, aminoalkilamidy jednopodstawione przy atomie azotu oraz aminoalkilamidy dwupodstawione przy atomie azotu wspomnianych wyżej kwasów, a także styren, butadien i izopren. Korzystnymi komonomerami są styren, kwas akrylowy, metakrylan [2-hydroksy-3-[4-metylopiperazynylo]-propylu, a zwłaszcza metakrylan metylu.

Jeśli chodzi o monomery sieciujące, to można tu zastosować wiele różnych związków, które nadają polimerowi charakter sieci trójwymiarowej oraz nierozpuszczalność w wodzie końcowego produktu, na przykład monomery akrylowe lub związki olefinowe i inne znane, stosowane w tym celu substancje. Przykładami takich monomerów są: dwuakrylan 1,3-butyleny, dwumetakrylan glikolu etylenowego, dwumetakrylan 1,3-butyleny, dwuakrylan 1,6-heksametyleny, dwuakrylan etyleny, dwumetakrylan glikolu dwumetylenowego, N,N'-metylenobisakrylamid, dwumetakrylan glikolu neopentylenowego, trójmetakrylan 1,1,1-trójmetyloetanu oraz dwuwinylobenzen. Korzystnym monomerem sieciującym jest N,N'-metylenobisakrylamid.

Reakcje polimeryzacji i kopolimeryzacji inicjowane są wolnymi rodnikami. Odpowiednimi wolnorodnikowymi układami inicjującymi są te układy, które wytwarzają wolne rodniki z szybkością odpowiednią dla polimeryzacji lub kopolimeryzacji w warunkach łagodnych, narzucanych czułością termiczną enzymowej reszty komórki. Z tego też względu najkorzystniejsze są inicjujące układy redukująco-utleniające. Przykładami takich układów są związki nadtlenu, takie jak nadsiarczany amonu, sodu lub potasu, nadtlenek benzoilu oraz nadtlendwuwęglan dwu-/II-rzęd.butylu/ w połączeniu ze środkami redukującymi, takimi jak tiosiarczan sodu, metadwu-siarczyn sodu, sześciowodnian siarczanu żelazowo-amonowego, nityl kwasu dwumetyloaminopropionowego lub ryboflawina. Szczególnie korzystnym układem inicjatorowym jest układ, złożony z nitylu kwasu dwumetyloaminopropionowego i nadsiarczanu amonu.

Skład polimeru może się wahać w szerokich granicach, przy czym najkorzystniejszy skład, wyrażony w procentach molowych całej ilości monomeru wynosi 15–90% reaktywnego względem komórek monomeru, 0–60% komonomeru i 10–40% monomeru sieciującego. Proporcje takie są korzystne zarówno przy wiązaniu komórek z monomerem, jak i uprzednio wytworzonym polimerem.

W niektórych przypadkach komórki poddaje się działaniu wielofunkcyjnego reagenta sieciującego celem zmniejszenia strat enzymu z komórek. Chociaż dokładny mechanizm tego zjawiska nie jest w pełni zrozumiały, to jednak przyjmuje się, że jedna klasa reagentów wielofunkcyjnych reaguje i przez to sieciuje grupy aminowe w błonie komórki, efektywnie zmniejszając jej porowatość. Inna klasa tych związków daje taki wynik przez aktywację grup karboksylowych, występujących w błonie komórkowej, które to grupy reagują następnie z gru-

pami aminowymi błony komórkowej, tworząc wiązania amidowe. Typowymi przykładami pierwszej z tych klas reagentów są takie związki, jak aldehyd pirogronowy, glioksal, aldehyd hydroksyadypinowy, chlorek cyjanuru, czteroazanowana o-dwuazynidyna, bis-dwuazanowana benzydyna, 1,3-dwufluoro-4,6-dwunitrobenzen, tolueno-2,4-dwuzocyjanian, a zwłaszcza aldehyd glutarowy. Druga klasa związków obejmuje takie reagenty, jak chloromrówczan etylu oraz rozpuszczalne w wodzie karbodwuimidy, na przykład chlorowoderek 1-etylo-3-/3'-dwumetyloaminopropilo/-karbodwuimidu.

Komórki można poddać działaniu tych związków w czasie, przed, lub też po przyłączeniu ich do reaktywnego monomeru, bądź też polimeru. Podobnie jak związanie komórki, również tę obróbkę prowadzi się w środowisku wodnym. Reakcję tę można prowadzić efektywnie w szerokim zakresie temperatur, lecz korzystny zakres temperatur wynosi 5–50°C, a zwłaszcza 10–30°C. Zależnie od zastosowanej temperatury i charakteru reagenta obróbka taka wymaga zwykle czasu od 0,5–10 godzin, najkorzystniej 2–4 godziny. Niezbędna ilość użytego reagentu zmienia się znacznie i wynosi zwykle 1–50% wagowych masy komórek w stanie wysuszonym, a najkorzystniej 5–25% wagowych.

Opisany sposób unieruchomienia komórek przez wytworzenie chemicznych wiązań kowalentnych z nierozpuszczalnym w wodzie polimerem i ewentualną obróbkę, zmniejszającą utratę enzymu z komórek, daje cały unieruchomiony układ enzymowy bez konieczności wyodrębniania odpowiedniego enzymu. Dlatego też, ze względu na jego stabilność i szczególną postać, ułatwiającą odfiltrowanie, produkt ten można w efektywny sposób stosować w środowisku wodnym jako katalizator w procesach, wymagających bądź stosowania zawrotów, bądź też prowadzonych w sposób ciągły.

Sposób według wynalazku zilustrowano w poniższych przykładach.

Przykład I. Do 80 g metakrylanu glicydylu i 1,0 l wody dodano podczas mieszania 30 N,N'-metylenobisakrylamidu. Całość mieszano przez 15 minut w temperaturze pokojowej, dodano 10 g metakrylanu metylu i mieszaninę ochłodzono do temperatury około 5°C, po czym przepuszczano przez nią na zimno przez okres 15 minut gazowy azot. Następnie do mieszaniny dodano 20 ml nitrylu kwasu dwumetyloaminopropionowego i 2 g nadsiarczanu amonu i całość mieszano w atmosferze azotu, w temperaturze 10°C do chwili rozpoczęcia polimeryzacji, a następnie mieszano nadal 1 godzinę w temperaturze pokojowej, po czym całość odstawiono na okres 2 godzin. Do otrzymanego ciała stałego dodano 750 ml wody i całość energicznie mieszano w celu rozbicia polimeru. Ciało stałe odsączono, przemyto wodą i wysuszono na powietrzu, uzyskując 120 g białego rozdrobnionego polimeru.

Przesączono bulion fermentacyjny *Aspergillus niger* (NRRI-3, szczep Pfizera FD 2454), fermentowany w zanurzeniu w warunkach aerobowych w temperaturze 33°C przy wartości pH = 5,8–7,0 na podłożu glukozowym. Komórki przemyto wodą i odcisnięto do postaci pół suchej pasty. Komórki w ilości 250 g, 55 g suchej masy umieszczono w roztworze zawierającym 22 g, 25% wagowo, wodnego roztworu aldehydu glutarowego w 1000 ml wody. Wartość pH zawiesiny doprowadzono do 6,2 i mieszano przez 1 i 3/4 godziny w temperaturze pokojowej. Ciało stałe odsączono i przemyto wodą, uzyskując 104 g obrobionych wilgotnych komórek, posiadających 76% początkowej aktywności oksydazy glukozowej.

Zawiesinę 32 g wilgotnych obrobionych komórek i 16 g polimeru metakrylanu glicydylu w 240 ml wody mieszano przez okres 30 godzin w temperaturze pokojowej, a następnie przesączono. Ciało stałe przemyto wodą, uzyskując 126 g wilgotnych unieruchomionych komórek, posiadających 58% aktywności oksydazy glukozowej w stosunku do aktywności oryginalnych, nieobrabianych komórek.

Przykład II. Do zawiesiny 600 mg obrabianych, wilgotnych komórek *Aspergillus*, otrzymanych w sposób podany w przykładzie I (23 jednostki aktywności oksydazy glukozowej na 100 mg), w 20 ml acetonitrylu, dodano jednocześnie 600 mg chlorku metakroilu i 400 mg trójetyloaminy. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez okres 2 godzin, a następnie przeniesiono do 20 ml wody (wartość pH mieszaniny wynosiła 6,3). Do mieszaniny wodnej dodano w atmosferze azotu 1,3 g N,N'-metylenobisakrylamidu, 750 mg metakrylanu i 300 mg kwasu akrylowego, po czym pH mieszaniny doprowadzono do wartości 6,7 i dodano 0,5 ml nitrylu kwasu dwumetyloaminopropionowego i 250 mg nadsiarczanu amonu.

Po dwóch godzinach do środowiska reakcji wprowadzono dalsze 150 mg nadsiarczanu amonu i mieszano dalej przez 1 godzinę, a następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano równą jej objętość wody i odwirowano. Pozostałość odsączono i przemyto wodą, uzyskując 32,25 g wilgotnych unieruchomionych komórek, posiadających 78% aktywności oksydazy glukozowej w stosunku do aktywności oryginalnych nieobrabianych komórek.

Przykład III. Wilgotne unieruchomione komórki, otrzymane w sposób opisany w przykładzie I (47,3 g), umieszczono w 100 ml wodnego roztworu, zawierającego 10 g glukozy i całość mieszano w temperaturze pokojowej z napowietrzeniem przez okres 21 godzin. Uzyskano 99% konwersję do mieszaniny kwasu glukonowego i delta glukonolaktonu i oznaczono 67% oryginalnej aktywności enzymatycznej.

Utlębianie to można powtórzyć przy użyciu 30 g wilgotnych unieruchomionych komórek z przykładu II w 20 ml wodnego roztworu, zawierającego 2 g glukozy, uzyskując porównywalną konwersję i odzysk aktywności enzymatycznej.

Przykład IV. Bulion fermentacyjny *Proteus rettgeri* (ATCC 9250, szczep Pfizera FD 18470-76-60), fermentowany w zanurzeniu w warunkach aerobowych w temperaturze 28°C przy wartości pH = 6,8–7,0 na podłożu z kazeiny mlecznej odwirowano i komórki rozdrobniono w wodzie i odcisnięto do postaci półsuchej pasty. Do zawiesiny wilgotnych komórek (7,5 g suchej masy) w 100 ml wody dodano 4 g 25% wagowo wodnego roztworu aldehydu glutarowego. Całość mieszano przez okres 3 godzin przy wartości pH = 7,0, a następnie odwirowano.

Obrabiane komórki ponownie zawieszono w 100 ml wody i dodano podczas mieszania 7,5 g polimeru metakrylanu glicydylu z przykładu I. Całość mieszano przy wartości pH = 7,0, w temperaturze pokojowej, przez okres 30 godzin. Ciało stałe odsączono, przemyto wodą i przechowywano w postaci wilgotnego produktu do czasu użycia. Unieruchomione komórki wykazywały 65% aktywności komórek nieobrabianych, przy czym pomiar oparto na szybkości konwersji penicyliny G do kwasu 6-aminopenicylanowego (6-APA).

Przykład V. Do zawiesiny 20 g (5,0 g suchej masy) unieruchomionych komórek *Proteus rettgeri* z przykładu IV w 500 ml wody przy wartości pH = 8,0 i w temperaturze 37°C dodano 5 g soli potasowej penicyliny G. Wartość pH mieszaniny utrzymywano na poziomie 8,0, dodając i jednocześnie dokonując pomiaru 1 n roztwór NaOH, aż do całkowitego zakończenia hydrolizy, co nastąpiło po upływie 3 godzin.

Unieruchomione komórki odsączono, przemyto wodą i przechowywano w postaci wilgotnego produktu do dalszego użycia. Wartość pH przesączu doprowadzono do 2 przy użyciu 2 n roztworu HCl i ekstrahowano octanem etylu. Wartość pH otrzymanej warstwy wodnej doprowadzono do 4,3 przy użyciu 2 n roztworu NaOH, zatężono i ochłodzono, uzyskując białe, krystaliczne ciało stałe. Kryształy odsączono, przemyto wodą i wysuszono na powietrzu, otrzymując 2,17 g (wydajność 75%) czystego kwasu 6-aminopenicylanowego. Po 20 cyklach hydrolizy unieruchomione komórki zachowywały nadal około 50% aktywności acylazy penicyliny w stosunku do oryginalnych unieruchomionych komórek z przykładu IV.

Przykład VI. Do energicznie mieszanych w atmosferze azotu 3,6 g metakrylanu bromoacetylohydroksyetylu w 15 ml wody dodano 375 mg N,N'-metylenobisakryloamidu. Mieszaninę ochłodzono do temperatury 5°C i dodano 0,25 ml nitylu kwasu dwumetyloaminopropionowego i 38 g nadszarczanu amonu. Całość mieszano powoli w temperaturze pokojowej aż do rozpoczęcia polimeryzacji. Mieszało następnie zatrzymano i mieszaninę reakcyjną utrzymywano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Otrzymaną zawiesinę rozcieńczyło 25 ml wody i odsączono. Osad przemyto wodą i wysuszono na powietrzu, uzyskując 3,7 g polimeru.

Odcisnięte do stanu wilgotnego komórki *Proteus rettgeri* hodowane i wyodrębnione, jak w przykładzie IV (10 g, 2 g suchej masy), umieszczono w roztworze, zawierającym 0,8 g 25% wagowo wodnego roztworu aldehydu glutarowego w 50 ml wody. Wartość pH zawiesiny doprowadzono do 7,0, całość mieszano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej i odwirowano. Obrobione komórki rozdrobniono w 50 ml wody i odcisnięto do postaci półsuchej pasty.

Zawiesinę 10 g obrabianych komórek i 20 g polimeru metakrylanu bromoacetylohydroksyloacetylu w 120 ml wody energicznie mieszano przez okres 30 godzin w temperaturze pokojowej przy wartości pH = 7,0. Mieszaninę przesączono i ciało stałe przemyto wodą, uzyskując 36,8 g wilgotnych unieruchomionych komórek, posiadających 75% aktywności acylazy penicylinowej w stosunku do oryginalnych komórek, nie poddawanych obróbce.

Przykład VII. Do zawiesiny 46 g wilgotnych, unieruchomionych komórek z przykładu VI w 500 ml wody o wartości pH = 8,0 i w temperaturze 37°C dodano 5 g soli potasowej penicyliny G i wartość pH zawiesiny utrzymywano na poziomie 8,0 przez stałe dodawanie 1 n roztworu NaOH. W czasie dodawania rejestrowano wartość pH i hydrolizę doprowadzono do końca w ciągu 3 godzin. Unieruchomione komórki odsączono, przemyto wodą i przechowywano w stanie wilgotnym do dalszego użycia. Wartość pH przesączu doprowadzono do 7 przy użyciu 2 n roztworu HCl i ekstrahowano octanem etylu. Wartość pH warstwy wodnej doprowadzono przy użyciu 2 n roztworu NaOH do 4,3, zatężono i ochłodzono, uzyskując krystaliczny kwas 6-aminopenicylanowy.

Przykład VIII. Zawiesinę 25 g wilgotnych, poddanych obróbce komórek *Aspergillus niger*, takich jak w przykładzie I i 2 g metakrylanu glicydylu w 60 ml wody mieszano przez okres 17 godzin w temperaturze 7°C. Zawiesinę tę dodano do mieszaniny 2,2 g N,N'-metylenobisakryloamidu, 2 ml styrenu, 450 mg metakrylanu metylu, 0,5 ml nitylu kwasu dwumetyloaminopropionowego i 1,5 metakrylanu [2-hydroksy-3-(1-[4-metylopiperazylo]-propylu)] w 40 ml wody przy wartości pH = 6,8. Mieszaninę w atmosferze azotu zadano 200 mg nadszarczanu amonu i mieszano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Ciało stałe, uzyskane w wyniku reakcji, odsączono, przemyto wodą, uzyskując 43,6 g wilgotnych unieruchomionych komórek, posiadających 75% aktywności oksydazy glukozowej w stosunku do oryginalnych komórek, nie poddawanych obróbce.

Przykład IX. Wilgotne unieruchomione komórki (28,3 g) z przykładu VIII umieszczono w 200 ml wodnego roztworu, zawierającego 20 g glukozy i całość mieszano napowietrzając przez okres 21 godzin w temperaturze pokojowej. Otrzymano z wydajnością 80% mieszaninę kwasu glukonowego i delta glukonolaktonu. Zawiesinę reakcyjną przesączono i ciało stałe przemyto wodą, otrzymując 28 g wilgotnych unieruchomionych komórek, posiadających 82% oryginalnej aktywności enzymatycznej.

Przykład X. Zawiesinę 5 g odcisniętych do stanu wilgotnego komórek *Proteus rettgeri* hodowanych i wyodrębnionych, jak w przykładzie IV i 10 g polimeru metakrylanu glicydylu z przykładu I w 65 ml wody mieszano energicznie przez okres 24 godzin w temperaturze pokojowej. Mieszaninę przesączono i osad przemyto, uzyskując 26,9 g wilgotnych unieruchomionych komórek, wykazujących 62% początkowej aktywności acylazy penicylinowej.

Unieruchomione komórki (25 g, 1 g suchych komórek) umieszczono w roztworze zawierającym 0,4 g 25% wodnego roztworu aldehydu glutarowego w 50 ml wody. Wartość pH zawiesiny doprowadzono do 7,0 i mieszano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Zawiesinę przesączono i osad przemyto wodą, uzyskując 23,2 g wilgotnych, obrobionych, unieruchomionych komórek, wykazujących 79% aktywności acylazy penicylinowej w stosunku do unieruchomionych komórek, nie poddawanych obróbce.

Przykład XI. Do zawiesiny 12 g wilgotnych, unieruchomionych komórek, otrzymanych w przykładzie X, w 100 ml wody przy wartości pH = 8,0 i w temperaturze 37°C dodano 1 g soli potasowej penicyliny G i wartość pH mieszaniny reakcyjnej utrzymywano na poziomie 8,0, dodając 1 n roztwór NaOH przy jednoczesnym pomiarze pH. Rekcję doprowadzono do końca po upływie 3 godzin. Unieruchomione komórki odsączono, przemyto wodą i przechowywano w postaci wilgotnej do dalszego użycia. Wartość pH filtratu doprowadzono do wartości 2 za pomocą 2 n HCl i ekstrahowano octanem etylu. pH otrzymanej warstwy wodnej doprowadzono do wartości 4,3 za pomocą 2 n NaOH, zateżono tę warstwę i ochłodzono, otrzymując krystaliczny kwas 6-APA.

Przykład XII. Zawiesinę komórek *Aspergillus niger*, hodowanych i wyodrębnionych jak w przykładzie I (20 g, 4 g suchej masy) i 8 g metakrylanu glicydylu w 100 ml wody wytrząsano w temperaturze pokojowej przez okres 18 godzin, po uprzednim doprowadzeniu pH do wartości 7,5. Następnie dodano 1,5 g N,N'-metylenobisakrylamidu i otrzymaną zawiesinę mieszano w atmosferze azotu w ciągu 15 minut, po czym ochłodzono do temperatury 5°C, dodano 150 mg nadszarczanu amonu i 1 ml nitrylu kwasu dwumetyloaminopropionowego i całość mieszano w temperaturze otoczenia przez okres 3 godzin. Powstałe w reakcji ciało przesączono, przemyto wodą, uzyskując 71 g wilgotnych unieruchomionych komórek, wykazujących 62% oryginalnej aktywności oksydazy glukozowej.

Unieruchomione komórki (18 g, 1 g suchych komórek) umieszczono w roztworze, zawierającym 0,4 g 25% wagowo wodnego roztworu aldehydu glutarowego w 100 ml wody. pH zawiesiny doprowadzono do wartości 7,0 i całość mieszano przez okres 3 godzin w temperaturze pokojowej. Ciało stałe odsączono, przemyto wodą, uzyskując 17,3 g wilgotnych unieruchomionych komórek, poddanych obróbce, posiadających 75% aktywności oksydazy glukozowej w porównaniu z unieruchomionymi komórkami przed poddaniem ich obróbce za pomocą aldehydu glutarowego.

Przykład XIII. Wilgotne, poddane obróbce unieruchomione komórki (14 g) z przykładu XII umieszczono w 15 ml wodnego roztworu, zawierającego 1,5 g glukozy i całość mieszano przy napowietrzaniu w ciągu 21 godzin w temperaturze pokojowej, uzyskując konwersję do kwasu glukonowego oraz pozostałą aktywność enzymatyczną porównywalną z wynikami, uzyskanymi w przykładzie III.

Przykład XIV. Komórki *Rhodotorula gracilis* (NRRL Y1091, hodowla Pfizera FD 6521) wyodrębniono przez wirowanie z bulionu fermentacyjnego, poddanego fermentacji w zanurzeniu w warunkach aerobowych w temperaturze 28°C, przy wartości pH = 6,8-7,0 na podłożu glukozowym. 50 g przemytych komórek w 50 ml wody poddano działaniu 5 g polimerycznego metakrylanu glicydylu z przykładu I. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez okres 20 godzin. Zawiesinę przesączono i osad przemyto wodą, uzyskując 63 g wilgotnych unieruchomionych komórek, posiadających 49% oryginalnej aktywności amoniolazy fenyloalaninowej.

Przykład XV. pH zawiesiny 14,74 g wilgotnych, unieruchomionych komórek z przykładu XIV w 30 ml wody, zawierającej 2,25 g kwasu transcyamonowego, 6,52 g chlorku amonu i 3,3 ml stężonego wodorotlenku amonowego doprowadzono do wartości pH = 9,5. Mieszaninę wytrząsano w temperaturze 37°C przez 18 godzin, uzyskując wydajność około 90% w odniesieniu do 1-fenyloalaniny, obliczone z odzyskanego kwasu cyamonowego. Stałe reagenty odsączono, przemyto wodą, uzyskując 14 g wilgotnych unieruchomionych komórek, wykazujących 77% ich pierwotnej aktywności amoniolazy fenyloalaninowej. 1-fenyloalaninę wyodrębniono z przesączu przy użyciu znanych metod.

Przykład XVI. Zawiesinę 40 g przemitych komórek *Rhodotorula gracilis*, hodowanych i wyodrębnionych jak w przykładzie XIV oraz 8 g metakrylanu glicydylu w 80 ml wody mieszano w temperaturze pokojowej przez okres 1,5 godzin, po uprzednim doprowadzeniu pH do wartości 7,2. Następnie dodano 1,5 g N,N-metylenobisakrylamidu i otrzymaną zawiesinę mieszano w atmosferze azotu przez 10 minut, po czym ochłodzono do temperatury 5°C, dodano 150 mg nadsiarczuanu amonu i 1 ml nitrylu kwasu dwumetyloaminopropionowego i całość mieszano w temperaturze pokojowej przez okres 3 godzin. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono wodą i przesączono. Polimeryczny osad przemyto wodą, uzyskując 6 62,3 g wilgotnych unieruchomionych komórek, wykazujących 44% oryginalnej aktywności amoniolazy fenyloalaninowej.

Przykład XVII. pH zawiesiny 15 g wilgotnych, unieruchomionych komórek z przykładu XVI w 30 ml wody, zawierającej 1,12 g kwasu transcynamonowego, 320 mg chlorku amonu i 1,6 ml stężonego roztworu amoniaku doprowadzono do wartości pH = 9,5. Mieszaninę wytrząsano w temperaturze 37°C przez 18 godzin, uzyskując wydajność 1-fenyloalaniny, porównywalną z uzyskaną w przykładzie XV.

Przykład XVIII. Zawiesinę 15 g odcisniętych do stanu wilgotnego komórek *Proteus rettgeri*, wyhodowanych i wyodrębnionych, jak w przykładzie IV oraz 30 g polimeru metakrylanu glicydylu z przykładu I w 100 ml wody energicznie mieszano w temperaturze pokojowej przy wartości pH = 7 przez okres 18 godzin. Zawiesinę następnie odwirowano i ciało stałe przemyto wodą, uzyskując 100 g wilgotnych, unieruchomionych komórek, posiadających 100% początkowej aktywności acylazy penicylinowej.

Do zawiesiny 25 g wilgotnych, unieruchomionych komórek w 70 ml wody przy wartości pH = 8,0, w temperaturze 37°C dodano 1 g soli potasowej penicyliny G. Hydrolizę prowadzoną przy wartości pH = 8,0, utrzymywanym przez ciągłe dodawanie 1 n roztworu NaOH z jednoczesnym pomiarem pH, doprowadzono do końca w ciągu 3 godzin. Następnie zawiesinę przesączono i unieruchomione komórki przemyto wodą i przechowywano w postaci wilgotnej do dalszego wykorzystania. Efektywność tych komórek w procesie wytwarzania kwasu 6-aminopenicylanowego nie była tak duża, jak efektywność unieruchomionych komórek z przykładu IV, ponieważ komórki zachowywały po dwóch cyklach hydrolizy jedynie 15% aktywności acylazy penicylinowej w porównaniu z oryginalnymi komórkami.

Przykład XIX. Do 25 g metakrylanu 2-hydroksyetylu w 100 ml wody dodano 12,5 g bromocyjanu, rozpuszczonego w 100 ml wody, pH mieszaniny natomiast doprowadzono do wartości 11,5 n roztworem NaOH, co spowodowało wzrost temperatury reakcji do 46°C, wartość pH utrzymywano na tym samym poziomie aż do momentu, gdy przestało być konieczne dalsze dodawanie zasady. Mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej, pH doprowadzono do wartości 6,6 i dodano zawiesinę 50 g suszonych przez wymrażanie komórek *Proteus rettgeri*, uprzednio wyhodowanych i wyodrębnionych w sposób opisany w przykładzie IV, które rozdrobniono w 500 ml wody.

Otrzymaną zawiesinę mieszano 45 minut. Następnie dodano 25 g akryloamidu i 2,5 g N,N'-metylenobisakrylamidu i zawiesinę mieszano 15 minut, ochłodzono do temperatury 4°C i dodano 4 ml nitrylu kwasu dwumetyloaminopropionowego i 425 mg nadsiarczuanu amonu. Mieszaninę polimeryzacyjną odstawiono celem ogrzania do temperatury pokojowej i utrzymywano w ciągu 1 godziny. Następnie całość wymieszano w mieszalniku Waringa i odwirowano. Uzyskane ciało stałe, podobne do żelu rozdrobniono do postaci zawiesiny w wodzie, powtórnie odwirowano, przemyto wodą i suszono przez wymrażanie, uzyskując 112 g suchych, unieruchomionych komórek, wykazujących 19% początkowej aktywności acylazy penicylinowej.

Przykład XX. Do zawiesiny 20 g odcisniętych do stanu wilgotnego komórek *Proteus rettgeri*, hodowanych i wyodrębnionych jak w przykładzie IV, w 80 ml wody dodano 1 g 25% wagowo, wodnego roztworu aldehydu glutarowego i 10 g metakrylanu glicydylu. pH zawiesiny doprowadzono do wartości 6,8 i całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Mieszaninę w atmosferze azotu poddano działaniu 1,9 g N,N'-metylenobisakrylamidu i 2 g nitrylu kwasu dwumetyloaminopropionowego, jej pH doprowadzono do wartości 7 i dodano 200 mg nadsiarczuanu amonu.

Otrzymaną zawiesinę mieszano przez 0,5 godziny, a następnie odstawiono w temperaturze pokojowej na 1,5 godziny. Ciało stałe odsączono i przemyto wodą, uzyskując 81,3 g wilgotnych unieruchomionych komórek, wykazujących 54% oryginalnej aktywności acylazy penicylinowej, w porównaniu z nieobrabanymi komórkami.

Wilgotne, unieruchomione komórki stosowano w reakcji konwersji soli sodowej penicyliny G do kwasu 6-aminopenicylanowego, zgodnie z przykładem VII, uzyskując porównywalne wyniki.

Przykład XXI. Bulion fermentacyjny *Bacterium cadaveris* (ATCC 9760, szczep Pfizera FD 24016), hodowany w zanurzeniu w warunkach aerobowych w temperaturze 28°C, przy wartości pH = 6–8 na podłożu hydrolizatu białkowego odwirowano i komórki rozdrobniono w wodzie i odcisnięto do postaci półsuchej pasty. Do zawiesiny wilgotnych komórek (7,5 g suchej masy) w 100 ml wody dodano 4 g 25% wagowo, wodnego roztworu aldehydu glutarowego. Całość mieszano przez około 2 godzin przy wartości pH = 7, a następnie

odwirowano. Poddane obróbce komórki rozdrobniono do postaci zawiesiny w 100 ml i dodano 7,5 g polimeru metakrylanu glicydydu z przykładu I podczas mieszania. Całość mieszano przy wartości $pH =$ około 7,0, w temperaturze pokojowej przez okres 30 godzin. Ciało stałe odsączono, przemyto wodą i przechowywano w postaci wilgotnej do czasu użycia.

Przykład XXII. 120 g kwasu fumarowego dodano do 140 ml stężonego roztworu amoniaku. pH mieszaniny doprowadzono do wartości 8,5 wodorotlenkiem amonowym, a objętość układu doprowadzono do 600 ml przez dodanie wody. Unieruchomione komórki z przykładu XXI, posiadające 7000 aktywności amoniolazy asparginianowej, dodano do mieszaniny i całość mieszano w temperaturze $37^{\circ}C$ przez okres 4 godzin. Po przesączeniu mieszaniny reakcyjnej pH przesącza doprowadzono do wartości 2,8 kwasem siarkowym, co spowodowało wytrącanie się kwasu asparginowego.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób unieruchomiania komórek drobnoustrojów, z n a m i e n n y t y m, że komórki kontaktuje się z wielofunkcyjnym reagentem sieciującym i traktowane w ten sposób komórki kontaktuje się w środowisku wodnym z nierozpuszczalnym w wodzie, rozdrobnionym polimerem do czasu utworzenia kowalentnych wiązań komórek z polimerem, przy czym stosuje się polimer otrzymany w wyniku polimeryzacji, prowadzonej w obecności monomeru sieciującego i inicjatora polimeryzacji monomeru o wzorze 1, w którym R_1 oznacza atom wodoru lub chloru albo grupę metylową, a W oznacza grupę o wzorze 2, 3, 4 lub 5, w których to wzorach R_2 oznacza atom chlorowca, grupę azydową, grupę 2,3-epoksypropoksy, grupę epitiopropoksy, grupę N-/2,3-epoksypropylo/-aminową, grupę N-[/p-dwuazoniochloro/-fenylo]-aminową, grupę akryloiloksy, niższą grupę alkoksycarbonyloksy lub grupę benzenosulfonyloksy, X oznacza atom tlenu lub grupę NR_3 , w której R_3 oznacza atom wodoru lub grupę alkilową, zawierającą 1–6 atomów węgla, Y oznacza ugrupowanie alkilenowe, zawierające 2 lub 3 atomy węgla, n oznacza liczbę całkowitą, wynoszącą 1 lub 2, Z oznacza grupę chlorowcoacetylenową, grupę 2-/4,6-dwuchloro/-s-triazynyłową, grupę p-toluenosulfonyłową, grupę p-/chlorowcometylo/benzoilową lub grupę cyjanową, a $X' = X$, pod warunkiem, że jeżeli Z oznacza grupę p-toluenosulfonyłową, to X' oznacza atom tlenu.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się wielofunkcyjny reagent sieciujący, zdolny do tworzenia wiązań z grupami aminowymi komórek drobnoustrojów.

3. Sposób według zastrz. 2, z n a m i e n n y t y m, że jako wielofunkcyjny reagent sieciujący stosuje się aldehyd glutarowy.

4. Sposób unieruchomiania komórek drobnoustrojów, z n a m i e n n y t y m, że komórki kontaktuje się z wielofunkcyjnym reagentem sieciującym i traktowane w ten sposób komórki kontaktuje się w środowisku wodnym z nierozpuszczalnym w wodzie, rozdrobnionym polimerem do czasu utworzenia kowalentnych wiązań komórek z polimerem, przy czym stosuje się polimer otrzymany w wyniku polimeryzacji, prowadzonej w obecności monomeru sieciującego i inicjatora polimeryzacji monomeru o wzorze 1, w którym R_1 oznacza atom wodoru lub chloru albo grupę metylową, a W oznacza grupę o wzorze 4 lub 5, w których to wzorach R_2 oznacza grupę hydroksylołą, X oznacza atom tlenu lub grupę NR_3 , w której R_3 oznacza atom wodoru lub grupę alkilową, zawierającą 1–6 atomów węgla, Y oznacza ugrupowanie alkilenowe zawierające 2 lub 3 atomy węgla, n oznacza liczbę całkowitą wynoszącą 1 lub 2, Z oznacza atom wodoru, a $X' = X$, który to polimer aktywuje się przed reakcją związkiem, aktywującym grupę karboksylołą, o wzorze chlorowiec -- Z , w którym Z oznacza grupę chlorowcoacetylołą, grupę 2-/4,6-dwuchloro/-s-triazynyłową, grupę p-toluenosulfonyłową, grupę p-/chlorowcometylo/benzoilową lub grupę cyjanową.

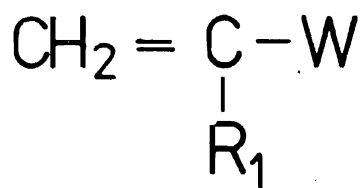
5. Sposób unieruchomiania komórek drobnoustrojów, z n a m i e n n y t y m, że komórki kontaktuje się z wielofunkcyjnym reagentem sieciującym i traktowane w ten sposób komórki kontaktuje się w środowisku wodnym z nierozpuszczalnym w wodzie, nienasyconym monomerem etylenowym, zawierającym grupy zdolne do reakcji z grupą aminową, do czasu utworzenia kowalentnych wiązań komórek z monomerem, a następnie polimeryzuje się ten monomer w obecności monomeru sieciującego i inicjatora polimeryzacji, przy czym stosuje się monomer o wzorze 1, w którym R_1 oznacza atom wodoru lub chloru albo grupę metylową, a W oznacza grupę o wzorze 2, 4, 3 lub 5, w których to wzorach R_2 oznacza atom chlorowca, grupę azydową, grupę 2,3-epoksypropoksy, grupę epitiopropoksy, grupę N-/2,3-epoksypropylo/-aminową, grupę N-[/p-dwuazoniochloro/-fenylo]aminową, grupę akryloiloksy, niższą grupę alkoksycarbonyloksy lub grupę benzenosulfonyloksy, X oznacza atom tlenu lub grupę NR_3 , w której R_3 oznacza atom wodoru lub grupę alkilową, zawierającą 1–6 atomów węgla, Y oznacza ugrupowanie alkilenowe, zawierające 2 lub 3 atomy węgla, n oznacza liczbę całkowitą, wynoszącą 1 lub 2, Z oznacza grupę chlorowcoacetylołą, grupę 2-/4,6-dwuchloro/-s-triazynyłową, grupę p-toluenosulfonyłową, grupę p-/chlorowcometylo/benzoilową lub grupę cyjanową, a $X' = X$, pod warunkiem, że jeżeli Z oznacza grupę p-toluenosulfonyłową, to X oznacza atom tlenu.

6. Sposób według zastrz. 5, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się wielofunkcyjny reagent sieciujący, zdolny do tworzenia wiązań z grupami aminowymi komórek drobnoustrojów.

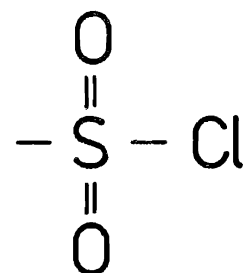
7. Sposób według zastrz. 5, z n a m i e n n y t y m, że jako wielofunkcyjny reagent sieciujący stosuje się aldehyd glutarowy.

8. Sposób unieruchomiania komórek drobnoustrojów, z n a m i e n n y t y m, że komórki kontaktuje się z wielofunkcyjnym reagentem sieciującym i traktowane w ten sposób komórki kontaktuje się w środowisku wodnym z nierozpuszczalnym w wodzie, nienasyconym monomerem etylenowym, zawierającym grupy zdolne do reakcji z grupą aminową, do czasu utworzenia kowalentnych wiązań komórek z monomerem, a następnie polimeryzuje się ten monomer w obecności monomeru sieciującego i inicjatora polimeryzacji, przy czym stosuje się monomer o wzorze 1, w którym R_1 oznacza atom wodoru lub chloru albo grupę metylową, a W oznacza grupę o wzorze 4 lub 5, w których to wzorach R_2 oznacza grupę hydroksylową, X oznacza atom tlenu lub grupę NR_3 , w której R_3 oznacza atom wodoru lub grupę alkilenową, zawierającą 1–6 atomów węgla, Y oznacza ugrupowanie alkilenowe, zawierające 2 lub 3 atomy węgla, n oznacza liczbę całkowitą, wynoszącą 1 lub 2, Z oznacza atom wodoru, a $X' = X$, który to monomer aktywuje się przed reakcją związkiem aktywującym grupę karboksylową, o wzorze chlorowiec – Z, w którym Z oznacza grupę chlorowcoacetylową, grupę 2-/4,6-dwuchloro/-s-triazynyłową, grupę p-toluenosulfonyłową, grupę p-chlorowcometylo/-benzoyłową lub grupę cyjanową.

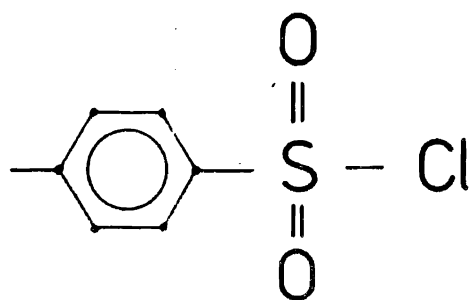
9. Sposób unieruchomiania komórek drobnoustrojów, z n a m i e n n y t y m, że komórki kontaktuje się w środowisku wodnym z aldehydem glutarowym i traktowane w ten sposób komórki kontaktuje się w środowisku wodnym z metakrylanem glicydylu do czasu utworzenia kowalentnych wiązań z monomerem, po czym polimeryzuje się otrzymany monomer w środowisku wodnym w obecności N,N' -metylenobisakryloamidu i nitrylu dwumetyloaminopropionowego z nadsiarczanem amonu.



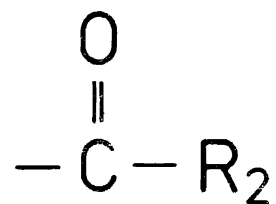
Wzór 1



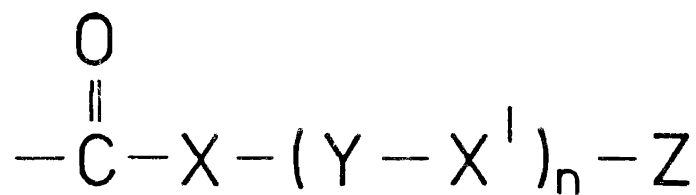
Wzór 2



Wzór 3



Wzór 4



Wzór 5