(19) DANMARK

PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 151637 B

P. B.

(21) Patentansøgning nr.: 1223/79

(51) Int.Cl.[4] C 12 N 11/16

(22) Indleveringsdag: 26 mar 1979

(41) Alm. tilgængelig: 28 sep 1979

(44) Fremlagt: 21 dec 1987

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 27 mar 1978 US 890500

(71) Ansøger: *MILES LABORATORIES INC.; 1127 Myrtle Street; Elkhart; Indiana 46514, US

(72) Opfinder: Gerald Baltzer *Borglum; US

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af bakteriecelleaggregat

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

SAMMENDRAG 1223-79

Et bakteriecelleaggregat, som har forøget partikelhårdhed, fremstilles ved at behandle en masse af bakteriecellerne, der fortrinsvis er glucoseisomerasedannende, med et tværbindende reaktionsprodukt af (1) glutaraldehyd, cyanursyrehalid eller kombinationer heraf og (2) en vandopløselig speciel kationisk polymer, der er tilvejebragt ved polymerisation af en epihalohydrin og en alkylenpolyamin med formlen $R^1R^2NRNH_2$, hvor R er C_{2-6}-alkylen og R^1 og R^2 er C_{1-6}-alkyl, indvinde det ved behandlingen opnåede aggregat og tørre aggregatet.

Molforholdet mellem epihalohydrin og polyamin er fra 0,6:1 til 2,7:1, og polymerisationen sker i flere trin.

Det tværbindende reaktionsprodukt dannes fortrinsvis ud fra 12-77 vægtprocent af (1) og 23-88 vægtprocent af (2), og omsætningen sker fortrinsvis ved pH 6-10 og en temperatur på 0-30°C i 0,5-1,5 timer.

Bakteriecellerne behandles fortrinsvis ved pH 8-9 og 0-30°C i 0,5-1,5 timer med 4,5-60 vægtprocent af det tværbindende reaktionsprodukt (baseret på tørvægten af cellerne).

DK 151637 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af et aggregat af bakterieceller, ved hvilken fremgangsmåde en bakteriecellemasse kontaktes med et tværbindingsmiddel, hvorpå det resulterende aggregat udvindes og, om ønsket, tørres.

De fremstillede bakteriecelleaggregater kan finde anvendelse til udførelse af enzymatiske processer, især hvis bakteriecellerne indeholder glucoseisomeraseaktivitet.

Glucoseisomerase er et enzym, som kan anvendes til at katalysere omdannelsen af glucose (dextrose) til fruktose (lævulose). Det er kendt, at glucoseisomerase kan produceres ved gæring af visse organismer, såsom Streptomyces flavovirens, Streptomyces echinatur, Streptomyces achromogenus, Streptomyces albus, Streptomyces olivaceus, Bacillus coagulans og lignende i passende næringsmedier. Glucoseisomerasen dannes inden i bakteriecellerne, som vokser under dets tilvejebringelse. Cellerne kan filtreres fra fermentationsmediet og anvendes direkte som glucoseisomerasekilde. Direkte kommerciel anvendelse af sådanne enzymholdige bakterieceller har imidlertid været besværliggjort af den væsentlige ulempe, at cellerne mistede enzymaktiviteten under anvendelsen, hvormed cellernes brugstid reduceredes. Denne ulempe blev overvundet ved at behandle bakteriecellerne med glutaraldehyd som beskrevet i beskrivelsen til US patent nr. 3.779.869. Andre metoder til immobilisering af enzymaktiviteten i bakterieceller samt til dannelse af aggregater af disse enzymholdige bakterieceller er beskrevet f.eks. i beskrivelsen til US patent nr. 3.821.086 og dets US Reissue patenter nr. 29.130 og nr. 29.136 samt i beskrivelsen til sydafrikansk patent nr. 73/5917. Beskrivelserne til ovennævnte US patenter angår anvendelsen af visse anioniske og kationiske polyelektrolytflokkuleringsmidler. I beskrivelsen til det sydafrikanske patent omtales forskellige kombinationer af bindemidler, forstærkningsmidler og tværbindende midler. Skønt ovennævnte teknik tilvejebragte bakteriecelleaggregater, der almindeligvis bevarede deres enzymaktivitet under anvendelsen, var der stadig behov for at øge aggregaternes hårdhed, således at de kunne anvendes kommercielt i reaktionslag med større dybde. I beskrivelsen til US patent nr. 3.935.069 er der beskrevet en tilsætning af visse metalliske forbindelser i forbindelse med polyelektrolytflokkuleringsmidler til forbedring af hårdheden. Denne teknik har imidlertid begrænset

anvendelighed.

Det har nu vist sig, at visse tværbindende reaktionsprodukter af glutaraldehyd og/eller cyanursyrehalid og en særlig epihalohydrin-polyaminpolymer frembringer bakteriecelleaggregater med i forhold til ovennævnte kendte aggregater forbedret hårdhed.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er i overensstemmelse hermed ejendommelig ved, at tværbindingsmidlet er et reaktionsprodukt af (1) et materiale udvalgt fra en klasse bestående af glutaraldehyd, cyanursyrehalid og kombinationer heraf og (2) en vandopløselig kationisk polymer tilvejebragt ved polymerisation af en epiholohydrin med en alkylenpolyamin, som har formlen $R_1R_2NRNH_2$, hvor R er en alkylengruppe, der har fra 2 til ca. 6 carbonatomer, og R_1 og R_2 hver er en alkylgruppe med fra 1 til ca. 6 carbonatomer, hvor molforholdet epihalohydrin til polyamin er på fra ca. 0,60:1 til ca. 2,7:1, hvilken polymerisation omfatter, at der med alkylenpolyaminen omsættes fra ca. 50 til ca. 90 procent af den mængde epihalohydrin, der skal polymeriseres, idet reaktionen får lov til at fortsætte indtil reaktionsmediet opnår en i alt væsentligt jævn viskositet, og at den resterende portion epihalohydrin omsættes trinvis til opnåelse af den kationiske polymer, hvor polymerisationstemperaturen er på fra ca. 60°C til 120°C.

Fremgangsmåden er særlig fordelagtig, når det resulterende aggregat tørres og derpå genhydreres ved senere brug. Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse kan anvendes med forskellige enzymholdige bakterieceller. Resten af beskrivelsen vil omhandle anvendelse af fremgangsmåden til bakterieceller indeholdende glucoseisomerasekativitet.

De glucoseisomeraseaktivitetsholdige bakterieceller, der er anvendelige ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, kan tilvejebringes ved velkendte procedurer. De foretrukne enzymholdige celler produceres ved under submerse aerobe forhold at dyrke en kultur af Streptomyces olivaceus NRRL 3583 eller en mutant heraf i et medium, der indeholder passende næringsstoffer. Dette er beskrevet i beskrivelsen til US patent nr. 3.625.828. De resulterende bakterieceller separeres fra fermentationsmediet ved filtrering eller centrifugering.

De bestanddele, som anvendes ved den foreliggende fremgangsmåde, er lettilgængelige. Glutaraldehyd og cyanursyrehalid, såsom cyanursyretrichlorid, cyanursyretribromid, cyanursyretriiodid og

lignende, er kommercielt opnåelige eller kan fremstilles ved velkendte fremgangsmåder. Den specielle epihalohydrin-polyaminpolymer, der anvendes ved fremgangsmåden, er kommercielt opnåelig under varemærket BETZ 1180 fra Betz Laboratories, Inc., Trevose, Pennsylvania. BETZ 1180 har en molekylvægt under en million, indeholder ca. 0,288 millimol aminogrupper pr. gram opløsning (baseret på en ninhydrinanalyse) og markedsføres som en opløsning, der indeholder 30 vægtprocent tørstoffer baseret på opløsningens samlede vægt. Denne forbindelse er beskrevet i beskrivelsen til US patent nr. 3.915.904. Forbindelsen er deri beskrevet som en vandopløselig kationisk polymer, der er opnået ved polymerisation af en epihalohydrin med en alkylenpolyamin, som har formlen $R_1R_2NRNH_2$, hvor R er en alkylengruppe, der har fra 2 til ca. 6 carbonatomer, og R_1 pg R_2 hver er en alkylgruppe på fra ca. 1 til ca. 6 carbonatomer, hvor molforholdet epihalohydrin til polyamin er på fra ca. 0,60:1 til ca. 2,7:1, hvilken polymerisation omfatter, at der med alkylenpolyaminen omsættes fra ca. 50 til ca. 90 procent af den mængde epihalohydrin, der skal polymeriseres, idet reaktionen får lov til at fortsætte indtil reaktionsmediet opnår en i alt væsentligt jævn viskositet, og at den resterende portion af epihalohydrinen omsættes trinvis til opnåelse af den kationiske polymer, hvor polymerisationstemperaturen er på fra ca. 60°C til ca. 120°C. Dette materiale vil herefter blive omtalt som "polyaminpolymeren".

Glutaraldehydet og/eller cyanursyrehalidet, som kollektivt identificeres som komponent (1), omsættes med polyaminpolymeren, der identificeres som komponent (2), ved et pH omkring 6 til 10 og ved ca. 0° til 30°C i ca. 0,5 til 2,5 timer. Det samlede tværbindende reaktionsprodukt indeholder fra ca. 12 til 77 vægtprocent af komponent (1) og fra ca. 23 til ca. 88 vægtprocent af komponent (2) baseret på den samlede vægt af de aktive bestanddele i komponenterne (1) og (2). Reaktionsproduktets glutaraldehydindhold er på fra ca. 0 til ca. 77 vægtprocent, og cyanursyrehalidindholdet er på fra ca. 0 til 22 vægtprocent baseret på den samlede vægt af de aktive bestanddele i komponenterne (1) og (2).

Reaktionen mellem glutaraldehyd og polyaminpolymeren udføres fortrinsvis ved pH 8 til 9 og ved ca. 18°C til 25°C i ca. 0,5 time. Glutaraldehydet bør være til stede i et molforhold på mindst ét mol pr. mol aminogrupper i polyaminen for at undgå uønsket tværbinding af polyaminpolymeren med glutaraldehyd.

Reaktionen mellem cyanursyrehalid alene og polyaminpolymeren udføres fortrinsvis ved pH 8 til 9 og ved 0° til 10°C i ca. 1 til 2 timer. Cyanursyrehalidet bør være til stede i et molforhold på mindst ét mol pr. mol aminogrupper i polyaminpolymeren for at undgå uønskelig tværbinding af polyaminpolymeren med cyanursyrehalid. Cyanursyrehalider, såsom cyanursyretrichlorid, har tre halogenreaktive steder. Et af disse steder vil reagere ved 0°C eller mere. Efter omsætning ved det første sted vil det andet sted reagere ved 30° til 50°C, og det sidste sted vil reagere ved 90° til 100°C. Det er ønskeligt kun at omsætte det første sted på cyanursyrehalidet med polyaminpolymeren til at begynde med. Når det resulterende tværbindende reaktionsprodukt senere omsættes med bakteriecellerne og opvarmes til højere temperaturer under tørring vil de resterende reaktive steder på cyanursyrehalidet derpå reagere med polyaminpolymeren til tilvejebringelse af yderligere tværbinding til bakteriecelleaggregatet.

Reaktionen mellem polyaminpolymeren og kombinationen af glutaraldehyd og cyanursyrehalid udføres i trin. Først omsættes cyanursyrehalidet med polyaminpolymeren ved pH 8 til 9 og ved 0° til 10°C i ca. 1 til 2 timer. I denne situation har reaktanterne fortrinsvis et molforhold på 1 mol cyanyrsyrehalid til 2 mol aminogrupper på polyaminpolymeren. Derpå tilsættes en overskydende mængde glutaraldehyd, og reaktionen fortsættes ved samme pH- og temperaturbetingelser i ca. 0,5 time.

Det tværbindende reaktionsprodukt, som anvendes ved den foreliggende opfindelse, er ikke en kationisk polyelektrolyt, eftersom aminogrupperne på polyaminpolymeren, som initialt tilvejebragte den kationiske karakter, er blevet omsat med glutaraldehydet og/eller cyanursyrehalidet og er således ikke længere til rådighed.

Bakteriecelleaggregaterne fremstilles ved at kontakte en bakteriecellemasse med det tværbindende reaktionsprodukt, der er fremstillet som beskrevet ovenfor, ved pH ca. 8 til 9 og ved ca. 0° til 30°C i ca. 0,5 til 1,5 time. Det tværbindende reaktionsprodukt anvendes i en sådan mængde og koncentration, at bakteriecellerne kontaktes med fra ca. 4,5 til ca. 60 vægtprocent af de aktive bestanddele i det tværbindende reaktionsprodukt baseret på cellernes tørvægt.

Efter at ovenstående reaktion har fundet sted, ekstruderes det resulterende bakteriecelleaggregat fortrinsvis eller tildannes på anden måde til ønskelige former og tørres derpå ved ca. 65°C i

adskillige timer. Det resulterende tørrede aggregat kan opbevares indtil det senere skal bruges i en enzymproces. Da genhydreres og konditioneres det tørrede aggregat til brug. En illustrativ konditioneringsproces er beskrevet i beskrivelsen til US patent nr. 3.974.036.

En hovedfordel ved den foreliggende opfindelse er en øgning af bakteriecelleaggregatets hårdhed efter genhydrering i sammenligning med hidtil kendte bakteriecelleaggregater. Hårdheden udtrykkes i relation til bakteriecelleaggregatpartiklernes kompressionsresistens. Der anvendes hertil en Instron Tensile Tester under anvendelse af en Compression Load Cell No. CCT på en måde svarende til den, der er beskrevet i beskrivelsen til US patent nr. 3.935.069. Dette instrument er opnåeligt fra Instron Corporation, Canton, Massachusetts.

Det efterfølgende er genhydreringshårdhedsprøveproceduren:

En genhydreringsopløsning fremstilles ved at blande 9,68 g $CoCl_2.6H_2O$, 28,0 g $Mg(OH)_2$ og 56,0 g vandfri citronsyre i 600 ml destilleret vand ved 45°C. Blandingen omrøres og opvarmes til 60°C til opløsning af alle saltene. Den afkøles derpå til 25°C og indstilles på pH 8,5 med NaOH. Derpå filtreres den og bringes til et volumen på 1,0 l med destilleret vand. En 2,5 ml portion af opløsningen ovenfor blandes med 130 ml vand, 70,3 g dextrose, 24,228 g tris-(hydroxymethyl)aminomethan og indstilles på pH 8,55 ved 25°C med NaOH. Den fyldes derpå op til 200 ml med destilleret vand.

Fem partikler tørret bakteriecelleaggregat dækkes med 2,5 ml af ovennævnte genhydreringsopløsning i en petriskål og opvarmes ved 60°C i vandbad i 1 time og får derpå lov til at stå ved stuetemperatur, indtil de er afkølet. Partiklerne fjernes fra opløsningen, overskydende overfladevæske fjernes, og de testes derpå på Instron-instrumentet. Instrumentet varmes op i mindst 30 minutter med belastningscellen tilkoblet inden det anvendes til målinger. Krydshovedhastigheden indstilles på 5,1 mm/min (0,2 in/min) og papirhastigheden på 51 mm/min (2,0 in/min). "Return" indstilles til stop ved 0,965 mm (0,038 in) før overfladen af belastningscellen. "Gage length" indstilles til at prøvekoppens rand går fri. Recorderen indstilles til fuldt skalaområde. Dette er sædvanligvis 4,54 kg (10 pound). Recorderen standardiseres til at vise 0 kg (0 pound) med prøvekoppen på belastningscellen og 0,454 kg (1 pound) med koppen og 0,454 kg (1 pound) standardvægt på belastningscellen. En enkelt genhydreret

partikel anbringes på prøvekoppen centreret med krydshovedet. Krydshovedet sænkes manuelt til partiklernes øverste del, og der trykkes på "run"-knappen. Kraften i kg (pound) aflæses på recorderen ved en afstand på 0,762 mm (0,03 in) fra det punkt, i hvilket krydshovedet rører partiklen. Hårdheden udtrykkes således i den kraft (kilogram eller pound), der er nødvendig for at komprimere partiklen 0,762 mm (0,03 in). Prøven gentages med adskillige partikler, og gennemsnittet af resultaterne beregnes.

Opfindelsen beskrives i yderligere detaljer i de følgende illustrative eksempler.

EKSEMPEL 1

Et tværbindende reaktionsprodukt tilvejebragtes ved at tilsætte 2,25 g BETZ 1180 opløsning indeholdende 0,675 g aktivt materiale og 0,648 millimol aminogrupper til 100 ml 1,25 procentig (vægt/volumenbasis) glutaraldehyd indeholdende 13,24 millimol aktivt materiale ved pH 9. Blandingen omrørtes i ca. 30 minutter og blev til en dybtgul opløsning. Det resulterende produkt dannedes ud fra en reaktionsblanding indeholdende 64,9 vægtprocent glutaraldehyd og 35,1 vægtprocent polyaminpolymer baseret på den samlede vægt af glutaraldehydet (komponent 1) og polyaminpolymeren (komponent 2).

En kultur af en mutant af Streptomyces olivaceus NRRL 3583 blev dyrket i et omrørt, beluftet gæringsapparat, der indeholdt et passende næringsmedium, som er beskrevet i beskrivelsen til US patent nr. 3.625.828. Den resulterende gæringssuppe, der indeholdt en bakteriecellemasse, blev indstillet på pH 8,2 ved tilsætning af passende pufferstoffer. En portion af den ovenfor fremstillede opløsning sattes til en portion af gæringssuppen i en sådan mængde, at det tilvejebragte det til 14 vægtprocent glutaraldehyd (21,6 vægtprocent totalt reaktionsprodukt) ækvivalente, baseret på bakteriecellernes tørvægt. Efter 30 minutters reaktionstid ved 25°C og pH 8,2 filtreredes den behandlede suppe. Filterkagen ekstruderedes derpå gennem en sprøjteåbning på 2,2 mm. De resulterende ekstruderede strenge blev skåret i 30 mm enkeltlængder og tørret natten over ved 65°C i en varmluftsovn med luftcirkulation. En tilsvarende portion af gæringssuppen blev behandlet med glutaraldehyd alene ved en koncentration på 14 vægtprocent baseret på bakteriecelletørvægten. De behandlede celler blev derpå filtreret, ekstruderet og tørret på samme måde til fremstilling af kontrolpartikler. Både kontrollen og de

med det tværbindende reaktionsprodukt behandlede materialer blev hårdhedsprøvet. Kontrolprøven havde en hårdhed på 0,364 kg (0,8 lb), medens det produkt, der var fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse, havde en forbedret hårdhed på 1,27 kg (2,8 lb).

EKSEMPEL 2

Portioner af Streptomyces olivaceus gæringssuppe svarende til den i eksempel 1 behandledes med glutaraldehyd alene (kontrol) og med forskellige kombinationer af tværbindende reaktionsprodukter ved pH 9 og 29°C. De forskellige tværbindende reaktionsprodukter var fremstillet som beskrevet i eksempel 1 ovenfor under anvendelse af forskellige mængder glutaraldehyd og polyaminpolymer. De behandlede bakterieceller blev derpå filtreret, ekstruderet, tørret og hårdhedsprøvet. Resultaterne er anført i følgende tabel I.

TABEL I

Reaktionsblanding til sammensætning af tværbindende reaktionsprodukt (vægtprocent)

Glutaraldehyd	Polyaminpolymer	Tilsat mængde (vægtprocent)	Hårdhed kg (lb)
100 (kontrol)		13,9	0,82 (1,8)
76,7	23,3	13	1,23 (2,7)
40,0	60,0	34,7	1,23 (2,7)
44,4	55,6	18,7	1,5 (3,3)
65,1	34,9	29,8	1,64 (3,6)

Det fremgår, at anvendelsen af det tværbindende reaktionsprodukt gør det muligt at opnå ensartet stigende hårdhed sammenlignet med den kendte anvendelse af glutaraldehyd alene.

EKSEMPEL 3

Et tværbindende reaktionsprodukt opnåedes ved at opløse 0,188 g cyanursyretrichlorid (0,64 millimol) i 10 ml acetone, og derpå sætte denne opløsning under omrøring til 70 ml iskoldt vand til tilvejebringelse af et findelt præcipitat. En 2,25 g portion BETZ

1180 opløsning (indeholdende 0,675 g aktivt materiale og 0,648 millimol aminogrupper) fortyndedes med 20 ml vand og tilsattes til cyanursyretrichloridsuspensionen. Den resulterende blanding blev omrørt og holdt ved pH 9 og 0-5°C i 1-2 timer og blev derefter fortyndet til 100 ml. Cyanursyretrichloridet opløstes, hvilket indicerede reaktion med polyaminen. Dette reaktionsprodukt hidrørte fra en reaktionsblanding, der indeholdt 21,8 vægtprocent cyanursyretrichlorid som komponent (1) og 78,2 vægtprocent polyaminpolymer som komponent (2). En portion Streptomyces olivaceus gæringssuppe svarende til den fra eksempel 1 blev blandet med en portion af ovennævnte reaktionsprodukt til tilvejebringelse af en koncentration på 32,0 vægtprocent reaktionsprodukt baseret på tørvægten af bakteriecellerne. En 0,2 procent (vægt/volumen-basis) vandig natriumbicarbonatopløsning tilsattes for at holde pH på 9. Efter 1,5 time ved pH 9 og 25°C blev den behandlede suppe filtreret, ekstruderet og tørret som beskrevet i eksempel 1. En anden portion af gæringssuppen blev behandlet som ovenfor i 0,5 time. Der tilsattes intet natriumbicarbonat til at begynde med, men de filtrerede celler vaskedes med 1 vægtprocent natriumbicarbonatopløsning ved pH 9 inden ekstrudering og tørring. Som kontrol blev der sat glutaraldehyd til en separat portion af gæringssuppen i en koncentration på 14 vægtprocent baseret på bakteriecellernes tørvægt. Cellerne behandledes med glutaraldehyd i 30 minutter ved pH 8,2 og 25°C inden filtrering, ekstrudering og tørring. Kontrollen udviste en hårdhed på 1 kg (2,2 lb), medens den 0,5 times reaktionsproduktbehandling udviste en hårdhed på 1,73 kg (3,8 lb), og 1,5 times reaktionsproduktbehandlingen udviste en hårdhed på 1,82 kg (4,0 lb).

EKSEMPEL 4

Et tværbindende reaktionsprodukt blev opnået ved at tilsætte 4,5 g BETZ 1180 opløsning (indeholdende 1,35 g aktivt materiale og 1,296 millimol aminogrupper) til 0,118 g (0,64 millimol) findelt cyanursyretrichlorid i iskoldt vand. pH-Værdien blev indstillet på 9 og blev holdt på pH 9 i et isbad (0°C) i 2 timer. Derpå tilsattes 1,25 g (13,24 millimol) glutaraldehyd ved pH 9, og den lave temperatur blev opretholdt i ca. 0,5 time. Der udvikledes en mørkegul farve. Reaktionsproduktet hidrørte fra en reaktionsblanding indeholdende 4,3 vægtprocent cyanursyretrichlorid, 46,0 vægtprocent glutaraldehyd (ialt 50,3 vægtprocent komponent 1) og 49,7 vægtprocent polyamin-

polymer som komponent (2). En portion Streptomyces olivaceus gæringssuppe svarende til den i eksempel 1 blev blandet med en portion af ovennævnte reaktionsprodukt til tilvejebringelse af en koncentration på 30,4 vægtprocent reaktionsprodukt baseret på bakteriecellernes tørvægt. Efter en 0,5 times reaktionsperiode ved pH 9 og 25°C blev den behandlede suppe filtreret, vasket med 5 vægtprocent vandig natriumbicarbonatopløsning ved pH 9, ekstruderet og tørret. En kontrolprøve blev fremstillet på samme måde som beskrevet i eksempel 3. Kontrollen udviste en hårdhed på 0,364 kg (0,8 lb), medens det tværbindende reaktionsprodukt udviste en hårdhed på 1,73 kg (3,8 lb).

EKSEMPEL 5

Portioner af Streptomyces olivaceus gæringssuppe svarende til den i eksempel 1 blev behandlet med glutaraldehyd alene (kontrol) og med forskellige reaktionsproduktkombinationer ved pH 9 og ved 25°C og 5°C. Til alle de tværbindende reaktionsprodukter anvendtes ét mol cyanursyretrichlorid pr. to mol aminogrupper i polyaminpolymeren. De samlede mængder glutaraldehyd og polyaminpolymer blev derpå justeret til tilvejebringelse af de kombinationer, som er anført i tabel II nedenfor. Derefter blev de behandlede bakterieceller filtreret, ekstruderet, tørret og hårdhedsprøvet. Resultaterne er anført i den efterfølgende tabel II.

TABEL II

Sammensætning af reaktionsblanding til tværbindende reaktionsprodukt

(vægtprocent)					
25°C					
Glutaraldehyd		Cyanursyre-trichlorid	Polyamin-polymer	Tilsat mængde (vægtprocent)	Hårdhed kg (lb)
100	(kontrol)	-	-	7	0,55 (1,2)
30,6		5,1	64,3	6,5	1,05 (2,3)
18,2		6,0	75,8	38,4	0,96 (2,1)
47,4		3,8	48,8	29,5	1,41 (3,1)
-		12,8	87,2	55,0	1,50 (3,3)
5°C					
100	(kontrol)	-	-	7	0,55 (1,2)
52,0		3,5	44,5	13,5	2,0 (4,4)
18,8		5,9	75,3	15,9	2,6 (5,7)

DK 151637B

Det skal bemærkes, at bakterieceller behandlet med de tværbindende reaktionsprodukter i alle ovenstående eksempler alle havde en signifikant øget hårdhedsværdi i sammenligning med de bakterieceller, der var behandlet med det kendte glutaraldehyd alene.

Når der anvendes et tværbindende reaktionsprodukt fremstillet ud fra glutaraldehyd og polyaminpolymer, fremstilles den foretrukne sammensætning af en blanding af 57,1 vægtprocent glutaraldehyd som komponent (1) og 42,9 vægtprocent polyaminpolymer som komponent (2) baseret på den samlede vægt af de aktive bestanddele i komponenterne (1) og (2). Denne sammensætning anvendes fortrinsvis i en mængde på 17,5 vægtprocent baseret på bakteriecellernes tørvægt.

Når der anvendes et tværbindende reaktionsprodukt, der er fremstillet ud fra glutaraldehyd, cyanursyretrichlorid og polyaminpolymer, fremstilles den foretrukne sammensætning ud fra en blanding af 54,9 vægtprocent glutaraldehyd og 3,6 vægtprocent cyanursyretrichlorid som komponent (1) og 41,5 vægtprocent polyaminpolymer som komponent (2) baseret på den samlede vægt af de aktive bestanddele i komponenterne (1) og (2). Denne sammensætning anvendes fortrinsvis i en mængde på 18,2 vægtprocent baseret på bakteriecellernes tørvægt.

De bakterieaggregater, der blev fremstillet på den måde, som er beskrevet ovenfor, var alle i stand til at omdanne glucose til fruktose. Glucoseisomeraseaktiviteten blev ikke svækket ved anvendelse af denne hidtil ukendte fremgangsmåde.

Patentkrav

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et aggregat af bakterieceller, ved hvilken fremgangsmåde en bakteriecellemasse kontaktes med et tværbindingsmiddel, hvorpå det resulterende aggregat udvindes og, om ønsket, tørres, kendetegnet ved, at tværbindingsmidlet er et reaktionsprodukt af (1) et materiale udvalgt fra en klasse bestående af glutaraldehyd, cyanursyrehalid og kombinationer heraf og (2) en vandopløselig kationisk polymer tilvejebragt ved polymerisation af en epihalohydrin med en alkylenpolyamin, som har formlen $R_1R_2NRNH_2$, hvor R er en alkylengruppe, der har fra 2 til ca. 6 carbonatomer, og R_1 og R_2 hver er en alkylgruppe med fra 1 til ca. 6 carbonatomer, hvor molforholdet epihalohydrin til polyamin er på fra ca. 0,60:1 til ca. 2,7:1, hvilken polymerisation omfatter, at der med alkylenpolyaminen omsættes fra ca. 50 til ca. 90 procent af den mængde epihalohydrin, der skal polymeriseres, idet reaktionen får lov til at fortsætte, indtil reaktionsmediet opnår en i alt væsentligt jævn viskositet, og at den resterende portion epihalohydrin omsættes trinvis til opnåelse af den kationiske polymer, hvor polymerisationstemperaturen er på fra ca. 60°C til 120°C.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at bakteriecellerne kontaktes med det tværbindende reaktionsprodukt ved pH ca. 8 til 9 og ca. 0°C til 30°C i ca. 0,5 til 1,5 timer.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at bakteriecellerne kontaktes med fra ca. 4,5 til ca. 60 vægtprocent af det tværbindende reaktionsprodukt baseret på tørvægten af cellerne.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at det tværbindende reaktionsprodukt hidrører fra reaktionen mellem fra ca. 12 til ca. 77 vægtprocent af komponent (1) og fra ca. 23 til ca. 88 vægtprocent af komponent (2) baseret på den samlede vægt af de aktive bestanddele i komponenterne (1) og (2).

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, kendetegnet ved, at komponent (1) i det tværbindende reaktionsprodukt indeholder fra ca. 0 til ca. 77 vægtprocent glutaraldehyd og fra ca. 0 til ca. 22 vægtprocent cyanursyrehalid.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at bakteriecellerne er af arten Streptomyces olivaceus.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at det tværbindende produkt hidrører fra reaktionen mellem 57,1

vægtprocent glutaraldehyd som komponent (1) og 42,9 vægtprocent af komponent (2) baseret på den samlede vægt af de aktive bestanddele i komponenterne (1) og (2), og hvor et sådant tværbindende reaktionsprodukt anvendes i en mængde på 17,5 vægtprocent baseret på bakteriecellernes tørvægt.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det tværbindende produkt hidrører fra reaktionen mellem 54,9 vægtprocent glutaraldehyd og 3,6 vægtprocent cyanursyretrichlorid som komponent (1) og 41,5 vægtprocent af komponent (2) baseret på den samlede vægt af de aktive bestanddele i komponenterne (1) og (2), og det tværbindende reaktionsprodukt anvendes i en mængde på 18,2 vægtprocent baseret på bakteriecellernes tørvægt.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det tværbindende reaktionsprodukt er tilvejebragt ved at omsætte komponenterne (1) og (2) ved pH ca. 6 til 10 og ca. $0^{o}C$ til $30^{o}C$ i ca. 0,5 til 2,5 timer.