



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2006123431/10, 22.11.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.11.2004

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
02.12.2003 GB 0327901.5

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2008 Бюл. № 1

(45) Опубликовано: 10.08.2011 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 4343900 A, 10.08.1982. US 4440858 A,
03.04.1984. US 4851342 A, 25.07.1989. EP
0307926 A2, 22.03.1989. RU 2196825 C2,
20.01.2003.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 03.07.2006

(86) Заявка РСТ:
EP 2004/013250 (22.11.2004)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2005/054488 (16.06.2005)

Адрес для переписки:
101000, Москва, М. Златоустинский пер., 10,
кв. 15, "ЕВРОМАРКПАТ", пат.пов. И.А.
Веселицкой, рег. № 0011

(72) Автор(ы):

**ГРИНХАЛ Стюарт (US),
САЙМС Кеннет Чарлз (GB),
АРМИТЕЙДЖ Ивонна (GB),
ХЬЮЗ Джонатан (GB),
РИЧАРДСОН Гэри (GB)**

(73) Патентообладатель(и):

**ЦИБА СПЕШИАЛТИ КЕМИКЭЛЗ УОТЕР
ТРИТМЕНТС ЛИМИТЕД (GB)**

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИИ, ВКЛЮЧАЮЩЕЙ ПОЛИМЕР (МЕТ)АКРИЛАМИДА, И КОМПОЗИЦИЯ, ПОЛУЧЕННАЯ УКАЗАННЫМ СПОСОБОМ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области биотехнологии. Способ получения композиции, включающей полимер (мет)акриламида, предусматривает полимеризацию (мет)акриламида или смеси мономера, включающей (мет)акриламид. (Мет)акриламид получают в результате биокаталитической реакции или ферментативного процесса, а биокатализатор включает фермент нитрилгидратазу. При этом

водный раствор (мет)акриламида содержит клеточный материал и/или компоненты ферментативного бульона. При этом не происходит удаления клеточного материала и/или компонентов ферментативного бульона из водного раствора (мет)акриламида. Указанным способом получают композицию для применения в качестве флокулянтов. Изобретение позволяет получить высокомолекулярные водорастворимые или набухающие полимеры с характеристической

RU 2 4 2 5 8 8 6 C 2

RU 2 4 2 5 8 8 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12P 13/00 (2006.01)*C07C 231/06* (2006.01)*C12N 9/78* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2006123431/10, 22.11.2004**(24) Effective date for property rights:
22.11.2004

Priority:

(30) Priority:
02.12.2003 GB 0327901.5(43) Application published: **10.01.2008 Bull. 1**(45) Date of publication: **10.08.2011 Bull. 22**(85) Commencement of national phase: **03.07.2006**(86) PCT application:
EP 2004/013250 (22.11.2004)(87) PCT publication:
WO 2005/054488 (16.06.2005)

Mail address:

**101000, Moskva, M. Zlatoustinskij per., 10, kv.
15, "EVROMARKPAT", pat.pov. I.A. Veselitskoj,
reg. № 0011**

(72) Inventor(s):

**GRINKhAL St'juart (US),
SAJMS Kennet Charlz (GB),
ARMITEJDZh Ivonna (GB),
Kh'JuZ Dzhonatan (GB),
RICHARDSON Gehri (GB)**

(73) Proprietor(s):

**TsIBA SPESHIALTI KEMIKEhLZ UOTER
TRITMENTS LIMITED (GB)**

(54) METHOD OF PREPARING COMPOSITION CONTAINING (METH)ACRYLAMIDE POLYMER AND COMPOSITION PREPARED BY SAID METHOD

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method of preparing a composition containing (meth)acrylamide polymer provides polymerisation of (meth)acrylamide and mixed monomer containing (meth)acrylamide. (Meth)acrylamide is produced by a biocatalytic reaction or an enzymatic process, and the biocatalyst contains the nitrile hydratase enzyme. An aqueous

solution of (meth)acrylamide contains a cell material and/or ingredients of an enzymatic broth. The cell material and/or the ingredients of the enzymatic broth are not removed from the aqueous solution of (meth)acrylamide. Said method is used to prepare the composition applied as flocculants.

EFFECT: invention allows producing high-molecular water-soluble or swelling polymers.

13 cl, 4 tbl, 3 ex

Изобретение относится к способу получения полимеров на основе этиленовоненасыщенных мономеров. В частности изобретение относится к способам получения этиленовоненасыщенных мономеров с использованием биокатализатора.

Хорошо известно применение биокатализаторов, таких как микроорганизмы, содержащие ферменты, для проведения химических реакций, или использование ферментов без микроорганизмов. Известно, что различные этиленовоненасыщенные мономеры можно получить превращением исходных субстратов в необходимые мономеры с использованием биокатализаторов.

Известно, что ферменты типа нитрилгидратазы катализируют гидратацию нитрилов непосредственно в соответствующие амиды. Обычно нитрилгидратазные ферменты можно синтезировать с помощью различных микроорганизмов, например, микроорганизмов рода *Bacillus*, *Bacteridium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Xanthobacter*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus* и *Comamonas*.

Синтез нитрилгидратазы микроорганизмами был многократно описан. Arnaud и др., *Agric. Biol. Chem.* 41: (11) 2183-2191 (1977), приводят характеристики фермента, полученного из *Brevibacterium* sp R312, который был назван «ацетонитрилаза». Этот фермент разлагает ацетонитрил до ацетата через амидный интермедиат. Asano et al., *Agric. Biol. Chem.* 46: (5) 1183-1189 (1982) выделили *Pseudomonas chlororaphis* B23, который продуцирует нитрилгидратазу, катализирующую превращение акрилонитрила в акриламид с производительностью 400 г/л акриламида.

Было установлено, что различные штаммы микроорганизма *Rhodococcus rhodochrous* весьма эффективно продуцируют фермент нитрилгидратазу. В патенте EP-0307926 описано культивирование *Rhodococcus rhodochrous*, особенно штамм J1, в культуральной среде, содержащей ионы кобальта. Нитрилгидратазу можно использовать для гидратации нитрилов до амидов и в частности для превращения 3-цианпиридина в никотинамид. В одном воплощении амид получают в культуральной среде микроорганизмов, в которой присутствует нитрил. В другом воплощении нитрильный субстрат добавляют в культуральную среду, в которой была накоплена нитрилгидратаза, для проведения реакции гидратации. Описано также выделение клеток микроорганизмов и нанесение их на подходящий носитель, например, иммобилизацией, и затем их контактирование с субстратом. *Rhodococcus rhodochrous* J1 также используют в промышленности для производства мономера - акриламида из акрилонитрила, и такой способ был описан Nagasawa and Yamada, *Pure Appl. Chem.* 67: 1241-1256 (1995). EP-A-0362829 описывает способ выращивания бактерий *Rhodococcus rhodochrous* в присутствии по меньшей мере мочевины или ионов кобальта для получения клеток *Rhodococcus rhodochrous* с активностью нитрилгидратазы. Отдельно описан *Rhodococcus rhodochrous* J1.

Leonova et al., в работе *Appl. Biochem. Biotechnol.* 88: 231-241 (2000), озаглавленной "Nitrile Hydratase of *Rhodococcus*", описывает рост и синтез нитрилгидратазы в *Rhodococcus rhodochrous* M8. Синтез NH на этом штамме индуцируется мочевиной в среде, которую также используют в качестве источника азота для роста этих организмов. Для достижения высокой активности нитрилгидратазы также необходим кобальт. Литературные источники рассматривают главным образом индукцию и эффекты метаболизма.

Leonova et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 88: 231-241 (2000), также утверждает, что в России акриламид получают в промышленности с применением *Rhodococcus*

rhodochrous M8. Патент России 1731814 описывает штамм *Rhodococcus rhodochrous* M8.

Штамм *Rhodococcus rhodochrous* M33, продуцирующий нитрилгидратазу в отсутствие индуцирующего агента, такого как мочевины, описан в патенте US-A-5827699. Этим штаммом микроорганизмов является *Rhodococcus rhodochrous* M8.

Акриламидный мономер особенно желательно получать путем биохимического синтеза. В обзоре Yamada and Kobayashi Biosci. Biotech. Biochem. 60: (9) 1391-1400 (1996), озаглавленном "Nitrile Hydratase and its Application to Industrial Production of Acrylamide", подробно описана разработка биокаталитического способа получения акриламида.

Подробно описаны три последовательно лучшие катализатора и их характеристики для получения акриламида и в частности катализатора третьего поколения *Rhodococcus rhodochrous* J1.

Известен также способ синтеза акрилата аммония непосредственно из акрилонитрила под действием фермента нитриказы. Патент WO-A-9721827 приводит получение концентрированного раствора (мет)акрилата аммония без существенной примеси (мет)акрилонитрила путем ферментативного гидролиза (мет)акрилонитрила водой в присутствии фермента нитриказы, который характеризуется K_m для (мет)акрилонитрила ниже 500 мкмоль и K_i для (мет)акрилата аммония больше 100000 мкмоль. Фермент можно получать из микроорганизмов *Rhodococcus rhodochrous*.

Nagasawa и сотр., Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 322-324 (1990), также описывают использование нитриказы из *Rhodococcus rhodochrous* J1 для синтеза акриловой и метакриловой кислот. Они изучили влияние на реакцию температуры, концентрации акрилонитрила и pH.

Нитриказу также применяли в качестве катализатора селективного гидролиза динитрилов, как показано Bengis-Garber и Gutman в Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 11-16 (1989). Микроорганизм *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 использовали в частности для селективного превращения фумаронитрила в 3-цианакриловую кислоту.

Комбинацию нитрилгидратазы и амидазы часто использовали для получения карбоновой кислоты из соответствующего нитрила. Например, в патенте US-A-2003/0148480 приведено использование нитрилгидратазы и амидазы из *Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D для получения акриловой и метакриловой кислот с высокими выходами и селективностью.

Стандартной практикой является удаление клеток биокатализатора из растущей среды перед использованием биомассы для получения мономера для того, чтобы избежать загрязнения мономера примесями, которые могут отрицательно повлиять на последующую полимеризацию мономера.

Общепринято, что даже малые количества примесей могут повлиять на полимеризацию мономеров или вообще ингибировать полимеризацию. Следует отметить, что иницирующие системы часто используют в очень малых, почти следовых количествах, и поэтому даже малые количества примесей могут их дезактивировать, прекращая полимеризацию или останавливая ее на короткое время.

Например, инициаторы полимеризации используют в очень малых количествах, и поэтому для их инактивации достаточно даже малых количеств примесей, приводящих к резкой остановке или ингибированию полимеризации. Такие примеси могут привести к разветвлению, кросс-сочетанию, обрыву цепей или другим воздействиям на полимер. Хотя известно, что целевое введение малых количеств специальных веществ необходимо для иницирования переноса цепи, разветвления или кросс-сочетания во время полимеризации, эти вещества вводят регулируемым образом в практически чистый мономер, чтобы получить особую молекулярную структуру. Последние

разработки по методике полимеризации позволили начинать процесс с практически чистыми мономерами и вводить следовые количества химических добавок для получения полимеров особенно высокой молекулярной массы или полимеров с особой молекулярной структурой. Следовательно, можно получать полимеры со свойствами, необходимыми для специального применения, например, для обезвоживания суспензий твердых веществ и получения твердых веществ с улучшенными свойствами, либо для достижения наилучшего сочетания влагоудержания, обезвоживания и формования в производстве бумаги.

Хорошо известна полимеризация ненасыщенных этиленовых мономеров в присутствии биокатализатора. Например, как следует из патента WO-A-92/0520, полиакриламиды с пониженным содержанием мономерного акриламида можно получить введением фермента амидазы в смесь мономеров перед полимеризацией. В этом способе клетки микробов, содержащие амидазу, отделяют от ферментативного бульона. Биокатализатор амидазу не вводят на стадии биокатализа, на которой образуется мономер, а добавляют на отдельной стадии. Суспензию амидазы использовали в относительно малых количествах, с тем чтобы удалить остаточные количества акриламида в полученном полимере. В процессе полимеризации использовали относительно высокие концентрации инициатора и получали низкомолекулярные полимеры для упрочнения грунта.

Патент WO-A-97/06248 описывает способ получения высокостабильной амидазы или нитриказы на непрерывной культуре при ограниченном использовании источника углерода, который представляет собой соответственно либо амид либо нитрил. Полученная таким образом амидаза эффективно превращает (мет)акриламид в (мет)акрилат аммония, и ее можно добавлять, например, во время или после полимеризации акриламида. Поэтому амидазу объединяют с мономером (мет)акриламидом для получения мономера акрилата аммония или амидазу объединяют с поли(мет)акриламидом для превращения остаточного свободного (мет)акриламида в полимерах в (мет)акрилат аммония. Раскрыты также объединение фермента амидазы и/или микроорганизмов в смеси для полимеризации, содержащей акриламид, и затем полимеризация с образованием полимера, при которой содержание остаточного (мет)акриламида уменьшается. В этом способе биокатализатор амидаза не участвует в образовании мономера, который будет полимеризоваться, а добавляется на отдельной стадии.

Вследствие того, что примеси имеют разнообразную природу, они могут оказывать неожиданное и обычно нежелательное влияние на полимер. Даже малые количества таких примесей могут оказать отрицательное воздействие на молекулярную структуру полимера и из-за этого полученный полимер может стать не пригодным для широкого применения.

Поэтому на практике обычно стараются избежать присутствия загрязнений в мономерах, предназначенных для полимеризации, с тем чтобы предотвратить изменения в молекулярной структуре и свойствах полимера. Это относится к мономеру, полученному как в присутствии синтетического катализатора, так и биокатализатора. Однако биологическое производство мономеров несет с собой повышенный риск загрязнения от клеточного материала и ферментативного бульона.

Загрязнения, которых обычно следует избегать, включают сахара, аминокислоты, соли металлов и полисахариды, белки и другие органические продукты, попадающие либо из среды, используемой для создания биомассы, либо из отработанной среды, а также в виде продуктов метаболизма растущих клеток или самого клеточного

материала или продуктов его распада и разрушения.

Патент WO-A-02/088372 приводит способ и устройство для получения водного раствора акриламида с использованием биокатализатора. Способ включает способ
5 разделения с целью удаления биокатализатора из полученного акриламида. Этот способ включает использование центрифуги и необязательно в комбинации с осаждением для удаления биокатализатора. Биокатализатор промывают водой для удаления оставшегося мономера, и воду затем используют в следующей реакции биоконверсии.

10 Maestracci с сотр., Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 36: 69-115 (1988), описывает использование *Brevibacterium* sp R312 для превращения α -аминонитрилов в соответствующие аминокислоты. Продукты отделяли, следуя хорошо известным методикам, включающим удаление клеток центрифугированием с последующей кристаллизацией.

15 Nagasawa с сотр., Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 322-324 (1990) рассматривают получение акриловой и метакриловой кислот с использованием нитрилазы из *Rhodococcus rhodochrous* J1. Для реакции использовали интактные клетки J1 в растворе буфера, в который вводили акрилонитрил. В статье сообщается о получении
20 ариловой кислоты с выходом 39%. Реакционную смесь центрифугировали для удаления клеток и выделяли акриловую и метакриловую кислоту из реакционной смеси с помощью диэтилового эфира.

Удаление биокатализатора - он может быть в виде либо целых клеток, либо части
25 клеточного материала; он может быть в виде разрушенных клеток и их содержимого и среды суспензии, частично очищенных ферментов или очищенных ферментов - и связанных с ферментацией веществ из мономера требует дополнительной дорогостоящей и трудоемкой переработки. Поэтому желательно разработать более дорогостоящий, но эффективный способ производства полимеров со специфическими
30 заданными свойствами из мономеров, полученных биологическим путем.

В настоящем изобретении авторы предлагают способ получения полимера из этиленовоненасыщенных мономеров, в котором мономер получают в результате биокаталитического или ферментативного процесса и в котором мономер содержит
35 клеточный материал и/или компоненты ферментативного бульона, а полимер получают полимеризацией этиленовоненасыщенного мономера или смеси мономеров, содержащей этиленовоненасыщенный мономер, в котором из этиленовоненасыщенного мономера практически не удаляют клеточный материал и/или компоненты ферментативного бульона.

40 Этиленовоненасыщенный мономер желательно получать биокаталитическим превращением подходящего субстрата, который может быть превращен в этиленовоненасыщенный мономер. Обычно субстрат приводят в контакт с биокатализатором и таким образом превращают его в этиленовоненасыщенный мономер, содержащий клеточный материал и необязательно ферментативные
45 компоненты. Иначе этиленовоненасыщенный мономер можно получить в результате ферментативного процесса. Желательно, чтобы биокатализатор представлял собой микроорганизм и процесс можно было проводить или внутри, или вне клетки микроорганизма. В случаях, когда способ осуществляется внутри клетки, способ
50 может быть реализован как биокаталитическая стадия в присутствии одного внутриклеточного фермента или же способ может быть частью метаболического пути микроорганизма, и тогда он может включать несколько биокаталитических стадий получения этиленовоненасыщенного мономера.

Авторы изобретения обнаружили, что для получения полимеров с заданными особенностями и свойствами нет необходимости удалять биокатализатор или ферментативный бульон. Под биокатализатором мы понимаем все микробные клетки, обладающие биокаталитической активностью; часть микробных клеток; материал микробных клеток в виде разрушенных клеток в суспензии и их содержимое; частично очищенные ферменты и очищенные ферменты; все микробные клетки или часть микробных клеток или ферментов или ферменты в ферментативной среде или в другой подходящей суспензии, такой как вода или физиологически совместимая среда. Далее термин биокатализатор относится к микробным клеткам или клеточному материалу, как описано здесь, и к любой другой форме биокатализатора, про которую известно, что она входит в фермент, и к любому связанному клеточному материалу, присутствующему вместе с ферментом, который может быть нужен или не нужен для проявления биокаталитической активности. Более того, способ позволяет получать этиленовоненасыщенные мономеры в присутствии биокатализатора, который, как ожидается, позволит получить мономер с высоким выходом при высокой конверсии субстрата и при очень низких концентрациях субстрата или побочных продуктов. Обычно существует опасение, что присутствие либо биокатализатора, либо ферментативного бульона отрицательно повлияет на полимеризацию и конечный полимер. Однако, вопреки этим ожиданиям оказалось, что полимеризация мономера в присутствии биокатализатора или ферментативного бульона позволяет получить целевой полимер без каких-либо отклонений.

Поэтому настоящее изобретение предоставляет возможность избежать удаления биокатализатора или ферментативного бульона. Таким образом, становится возможным избежать отделения биокатализатора от ферментативного бульона, так что мономер полимеризуют в присутствии как биокатализатора, так и ферментативного бульона. Альтернативно, биокатализатор можно удалить из смеси, например, на проходном фильтре, центрифугированием или осаждением, так что мономер полимеризуется в присутствии ферментативного бульона, но практически в отсутствие биокатализатора. Можно также удалить только ферментативный бульон до того, как биокатализатор будет использован для образования мономера, так что мономер полимеризуется в присутствии биокатализатора. Однако предпочтительно не удалять ни биокатализатор, ни ферментативный бульон из мономера до полимеризации.

Следовательно, в способе можно избежать стадии переработки, которая понадобилась бы для удаления биокатализатора из ферментативного бульона до получения мономера надлежащего качества и использования мономера для производства полимеров товарного качества. Более того, способ предпочтительно позволяет избежать стадии удаления биокатализатора из мономера до полимеризации. Кроме того, мономер можно получать, например, в результате ферментации и полученный таким образом мономер не надо выделять из ферментативного бульона до полимеризации.

Таким образом, способ настоящего изобретения не нуждается в дорогостоящем оборудовании для выделения биокатализатора - либо всех микробных клеток, либо части клеток, как было описано выше, - которое используется для удаления катализатора из ферментативного бульона или для удаления катализатора после получения мономера. Более того, нет необходимости очищать мономер до полимеризации.

Биокатализатор должен обладать способностью превращать субстрат в нужный

мономер. Вообще это может быть микроорганизм, способный генерировать ферменты, пригодные для нужного превращения. Также предпочтительны микроорганизмы, в том числе те, которые выделяют ферменты, катализирующие образование итаконовой кислоты, малеиновой кислоты и (мет)акриловой кислоты или их солей и производных как часть продуктов метаболизма. Например, это может быть микроорганизм, который выбирают из широкого набора классов микробов. Они включают, но не ограничиваются ими, микроорганизмы, выбранные из классов *Bacillus*, *Bacteridium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Xanthobacter*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus*, *Comamonas*, *Saccharomyces*, *Dietzia*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Agrobacterium*, *Mycobacterium*, *Methylophilus*, *Propionibacterium*, *Actinobacillus*, *Megasphaera*, *Aspergillus*, *Candida* и *Fusarium*. Кроме того, можно также использовать микроорганизмы, которые продуцируют мономеры путем катализа превращений субстратов, таких как молочная кислота, 3-гидроксипропионовая кислота и глицерин, которые затем реагируют в последующих процессах с образованием этиленовоненасыщенных мономеров. Другие предпочтительные микроорганизмы включают такие микроорганизмы, которые способны продуцировать ферменты, превращающие нитрилы в соответствующие амиды или карбоновые кислоты. Также предпочтительными являются микроорганизмы, способные продуцировать нитрилазу, превращающую (мет)акрилонитрил в (мет)акрилат, например, микроорганизмы класса *Rhodococcus*. Особенно предпочтительны микроорганизмы, которые могут генерировать нитрилгидратазу, способную превращать (мет)акрилонитрил в (мет)акриламид, например, класса *Rhodococcus*, особенно *Rhodococcus rhodochrous*. Особенно подходящим биокатализатором является новый штамм *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164, который описан и заявлен в нашей совместной патентной заявке UK 0327907.2, 2 декабря 2003 г., которой присвоен номер BT/3-22351/P2.

Штамм *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164

1. Источник и регистрация

Штамм выделен авторами из почвы в Bradford, England и зарегистрирован 5 марта 2003 г. в National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB), где ему присвоен инвентарный номер NCIMB 41164 по Будапештскому договору.

2. Морфологические и культуральные характеристики

(1) Полиморфный рост

(2) Подвижность: неподвижный

(3) Неспоровая форма

(4) Грамположительный

(5) Аэробный

(6) Рост на ферментативном агаре дает семежно-розовые круглые колонии через 48 час при 30°C.

Биокатализатор включает клеточный материал в виде целых клеток или разрушенных клеток или их части, включая полуочищенные или очищенные препараты ферментов и необязательно ферментативный бульон. Клеточный материал может включать любые компоненты микробной клетки, например, стенки клеток, нуклеиновые кислоты клеток (например, ДНК или РНК), цитоплазму или белки. Вообще количество клеточного материала в мономере составляет по меньшей мере 0,001 мас.% и обычно по меньшей мере 0,005 мас.%.

Ферментативный бульон может содержать любые типичные ингредиенты,

используемые для выращивания микроорганизмов, а также продукты и побочные продукты, продуцированные микроорганизмами. Типичные компоненты ферментативного бульона включают сахара, полисахариды, белки, пептиды, аминокислоты, источники азота, неорганические соли, витамины, регуляторы роста и индукторы ферментов. В частности, он может включать моносахариды или дисахариды типа сахаров; соли аммония или другие источники азота; неорганические соли типа фосфатов, сульфатов, солей магния, кальция, натрия и калия; соединения металлов; витамины и компоненты сложной ферментативной среды, например, жидкий кукурузный экстракт; пептон; экстракт дрожжей; органические или неорганические соединения, необходимые для роста микробов; специфические индукторы ферментов и органические кислоты, такие как цитраты или пируваты, и любые другие органические или неорганические соединения, которые могут способствовать хорошему росту данных микроорганизмов.

Этиленовоненасыщенный мономер может представлять собой любое вещество, которое можно получить биологически из исходного вещества или особенного вещества, которое называют субстратом. Желательно, чтобы мономер включал этиленовоненасыщенные амиды, N-замещенные амиды, карбоновые кислоты, соли карбоновых кислот, сложные эфиры карбоновых кислот, амины, включая свободные амины, первичные, вторичные, третичные амины и четвертичные аммониевые основания. Предпочтительно, чтобы мономер был акриловым. Также предпочтительно, чтобы этиленовоненасыщенный мономер растворялся в воде. Под растворимостью в воде авторы понимают растворимость мономера, равную по меньшей мере 5 г на 100 мл при 25°C. Более предпочтительно, чтобы этиленовоненасыщенный мономер был акриламидом или метакриламидом. Другие предпочтительные мономеры включают итаконовую кислоту (или ее соли), малеиновую кислоту (или ее соли) и (мет)акриловую кислоту (или ее соли и производные).

Этиленовоненасыщенный мономер можно использовать в способе как таковой в виде гомополимера или его можно смешивать с другими этиленовоненасыщенными мономерами с образованием смеси мономеров, которая полимеризуется с образованием сополимера этиленовоненасыщенного мономера. Для этой цели можно использовать любые сомомеры. Особенно желательно, чтобы этиленовоненасыщенный мономер был растворим в воде. Желательно, чтобы и сомономер был водорастворимым или потенциально водорастворимым, таким как ангидриды. Типичными сомомерами являются (мет)акриламид, (мет)акриловая кислота (или ее соли), итаконовая кислота (или ее соли), малеиновая кислота (или ее соли), малеиновый ангидрид, винилсульфоновая кислота (или ее соли), аллилсульфоновая кислота (или ее соли), 2-акриламид-2-метилпропансульфоновая кислота (или ее соли), диметиламиноэтил(мет)акрилат (или четвертичные аммониевые соли), N-винилпирролидон, N-винилформамид, винилацетат, акрилонитрил, (мет)акриловые сложные эфиры спиртов C₁₋₃₀. Соли указанных выше кислотных мономеров могут содержать любые подходящие катионы, но предпочтительно, чтобы это были соли щелочных металлов или аммония.

Способ настоящего изобретения особенно пригоден для получения высокомолекулярных водорастворимых или набухающих в воде полимеров. Полимеры могут быть, например, линейными, разветвленными или поперечно-сшитыми. Предпочтительно, чтобы полимеры были высокомолекулярными, водорастворимыми и имели характеристическую вязкость (IV) по меньшей мере 3 дл/г

(измеренную с помощью вискозиметра в 1М растворе хлорида натрия при 25°C). Обычно полимеры имеют характеристическую вязкость по меньшей мере 4 дл/г и обычно значительно выше, например, по меньшей мере 7 или 8 дл/г. Во многих случаях полимеры имеют характеристическую вязкость по меньшей мере 10 или 12 дл/г и до 20 или 30 дл/г.

Водорастворимый или набухающий в воде полимер, полученный согласно способу настоящего изобретения, может быть катионным, анионным, неионным или амфотерным. Он может быть линейным, разветвленным или поперечно-сшитым.

Поперечно-сшитые или разветвленные полимеры получают внедрением разветвляющего или поперечно-сшивающего реагента в смесь мономеров. Поперечно-сшивающий или разветвляющий реагент может представлять собой, например, би- или многофункциональное вещество, которое реагирует с функциональными группами на полимерной цепи, например, ионы поливалентных металлов или амины, которые могут реагировать с карбоксильными группами на полимере. Однако предпочтительно, чтобы поперечно-сшивающий или разветвляющий реагент был этиленовоненасыщенным полиэтиленовым соединением, которое начинает полимеризацию двух или более полимерных цепей. Такие типичные поперечно-сшивающие реагенты включают метилен-бис-акриламид, тетрааллиламмонийхлорид, триаллиламин и полиэтиленгликольдиакрилат. Полимеры могут быть сильно поперечно-сшитыми и поэтому не будут растворяться в воде, но будут набухать в воде. Или же полимер может быть водорастворимым и тогда будет либо линейным, либо слегка разветвленным, например, если он получен с использованием менее 10 м.д. поперечно-сшивающего/разветвляющего мономера.

Особенно предпочтительными полимерами, получаемыми по способу настоящего изобретения, являются гомополимеры или сополимеры акриламида или метакриламида. Желательно, чтобы сополимеры включали любой из указанных выше сомономеров, но предпочтительно, чтобы это был сополимер акриламида с акрилатом натрия или сополимер акриламида с четвертичными аммониевыми солями и кислыми солями диметиламиноэтил(мет)акрилата. Особенно предпочтительными гомо- или сополимерами акриламида являются высокомолекулярные полимеры с высокой характеристической вязкостью, как описано выше.

Обычно полимер получают из этиленовоненасыщенного мономера или смеси мономеров, содержащей этиленовоненасыщенный мономер, в условиях полимеризации. Это достигается путем нагревания или облучения, например, с использованием ультрафиолетового света. Предпочтительно вводить инициаторы полимеризации в мономер или в смесь мономеров. Желательно использовать окислительно-восстановительные инициаторы и/или термические инициаторы. Обычно окислительно-восстановительные инициаторы включают восстановитель типа сульфита натрия и диоксида серы и окислитель типа персульфата аммония или подходящего пероксида, например, трет-бутилпероксида. Для окислительно-восстановительного инициирования можно использовать до 10000 м.д. (в расчете на массу мономера) каждого компонента окислительно-восстановительной пары. Предпочтительно, чтобы количество каждого вводимого компонента окислительно-восстановительной пары составляло менее 1000 м.д., обычно в интервале от 1 до 100 м.д., нормально в интервале от 4 до 50 м.д. Отношение восстановителя к окислителю может находиться в пределах от 10:1 до 1:10, предпочтительно в интервале от 5:1 до 1:5, более предпочтительно от 2:1 до 1:2, например, около 1:1.

На полимеризацию можно также воздействовать, применяя термический

инициатор - один или в комбинации с другими системами инициаторов, например, окислительно-восстановительными инициаторами. Термическим инициатором может быть любой подходящий инициатор, который образует радикалы при повышенной температуре, например, азосоединения, такие как азобисизобутиронитрил (AZDN) и 4,4'-азобис-(4-циановалериановая кислота) (ACVA). Обычно термические инициаторы используют в количестве до 10000 м.д. в расчете на массу мономера. В большинстве случаев, однако, термические инициаторы используют в количестве от 100 до 5000 м.д., предпочтительно от 200 до 2000 м.д., обычно около 1000 м.д.

Обычно водный раствор водорастворимого мономера можно полимеризовать в растворе с образованием водного геля или в обращенной фазе, при которой водный раствор мономера суспендируют в жидкости, не смешивающейся с водой, и полимеризуют с образованием полимерных шариков, или альтернативно эмульгируют водный мономер в органической жидкости и затем иницируют полимеризацию.

Строго говоря, эмульсионная полимеризация протекает в мицеллах, но это не имеет места в наших обращенных системах. Примеры полимеризации в обращенной фазе приведены в патентах EP-A-150933, EP-A-102760 или EP-A-126528.

В другом варианте изобретения этиленовоненасыщенный мономер, необязательно смешанный с другими мономерами, можно получить с помощью биокатализатора и затем полимеризовать *in situ* с образованием полимера. Следовательно, этиленовоненасыщенный мономер можно получить и затем заполимеризовать в одном сосуде. Таким образом, этиленовоненасыщенный мономер получают из субстрата в сосуде и необязательно вводят в сосуд другие мономеры с образованием смеси мономеров. Этиленовоненасыщенный мономер или смесь мономеров затем полимеризуют, необязательно добавляя в сосуд инициаторы, и получают полимер в сосуде. Более того, способ можно еще удобнее адаптировать получением биокатализатора в том же сосуде, вводя в сосуд субстрат, который затем превращается в этиленовоненасыщенный мономер и затем полимеризуется в том же сосуде с образованием полимера, как показано выше.

Таким образом, способ настоящего изобретения предлагает то преимущество, что можно избежать необходимости удалять клетки, клеточный материал или белковый материал из каталитического бульона или удалять примеси или клеточный материал из мономера. Кроме того, продукт, получаемый этим способом, имеет новый состав.

Следующие примеры иллюстрируют изобретение.

Пример 1

(1) *Pseudomonas fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Aspergillus terreus* выращивают в ферментативном бульоне при 30°C вплоть до последней экспоненциальной фазы роста. Полученный ферментативный бульон центрифугируют для удаления биомассы, оставляя верхний слой.

(2) Готовят 25% раствор акриламида. К раствору добавляют раствор 10 м.д. гипофосфита натрия и 1000 м.д. трет-бутилпероксида. Устанавливают pH 4,0 с помощью уксусной кислоты. Раствор деаэрируют и добавляют раствор 1000 м.д. сульфата железа-аммония, после чего образуется полимер.

(3) Процедуру (2) повторяют с верхним слоем культуры организмов, описанной в (1), для получения раствора акриламида вместо водного раствора. Определяют молекулярную массу полимеров в полученных растворах и сравнивают с полимером, полученным с использованием воды для приготовления раствора акриламида. Результаты приведены в таблице 1. Молекулярные массы полимеров были практически одинаковыми.

Таблица 1	
Микроорганизм в верхнем слое	Молекулярная масса
Контроль (нет)	245600
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	231700
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	243600
<i>Aspergillus terreus</i>	248100

Пример 2

(1) *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 выращивают в 280 л ферментере, содержащем 180 л культурального раствора, содержащего следующие компоненты (г/л): кислый дикалийфосфат 0,7; кислый фосфат калия 0,3; глюкоза 1,0; мочеви́на 5,0; экстракт дрожжей 3,0; сульфат магния гептагидрат 0,5; хлорид кобальта гексагидрат 0,01. Устанавливают pH 7,2. Культуру выращивают при 30°C в течение 3 дней. Периодически к культуре добавляют глюкозу.

Активность нитрилгидратазы в ферментативном бульоне определяют через 15 час после ее получения, и она составляет 242000 ед/г при 25°C (700000 ед/л).

(2) 15 л ферментативного бульона из (1) смешивают с 35 л воды, эту суспензию затем помещают в 600 л реактор, содержащий 250 кг воды. Акрилонитрил подают в реактор в течение нескольких часов, пока концентрация акриламида не достигнет 46,8%. 25 кг раствора акриламида центрифугируют для удаления биокатализатора.

(3) Образцы центрифугированного и не центрифугированного акриламида из (2) полимеризуют как гомополимеры с использованием окислительно-восстановительного и термического инициатора с образованием гель-полимеров с IV примерно 17 дл/г. Измеряют также вязкость в сП, и оказывается, что между образцами, приготовленными с использованием как центрифугированного, так и не центрифугированного акриламида, нет никакой разницы. Результаты определения вязкости полимеров (сП) приведены в таблице 2.

Таблица 2					
Центрифугированный акриламид	Вязкость (сП)				
	Стандарт	Порция 1	Порция 2	Порция 3	Порция 4
	28	32	37	28	27
Акриламид, содержащий ферментативный бульон	Стандарт	Порция 5	Порция 6	Порция 7	Порция 8
	28	29	28	27	26

Технические условия по вязкости: 25-40 сП при скорости сдвига 250 с⁻¹

(4) Полимеры, полученные в (3), протестированы как флокулянты при дозах 16-28 мг/л с использованием 4% каолина в качестве субстрата при pH 2. Скорости осаждения приведены в таблице 3. Разница в свойствах полимерах при сравнении со стандартным образцом акриламида не наблюдается.

Таблица 3				
	Скорость осаждения (см/мин)			
	Доза полимера (мг/л)			
	16	20	24	28
Номер порции				
Стандарт	35,5	42,2	49,2	56,2
2	30,4	39,2	45,3	50,8
3	36,6	39,5	53,3	60,0
5	43,6	46,6	56,4	70,6
7	31,0	36,0	43,4	43,8

Пример 3

Готовят 30% (мас./мас.) раствор акриламида, содержащий до 20 мас.% ферментативного бульона микроорганизмов *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164.

Акриламид полимеризуется в ферментативном бульоне как гомополимер в присутствии окислительно-восстановительного и термического инициаторов с образованием гель-полимера с характеристической вязкостью примерно 17 дл/г. Результаты для 1 точки определения вязкости для каждого раствора полимеров приведены в таблице 4. Все данные по вязкости находятся в пределах технических условий для этого полимера.

Таблица 4	
Концентрация ферментативного бульона	Характеристическая вязкость (дл/г)
0	16,9
5	16,5
10	17,6
15	17,2
20	17,9

Формула изобретения

1. Способ получения композиции, включающей полимер (мет)акриламида, путем полимеризации (мет)акриламида или смеси мономера, включающей (мет)акриламид, в котором (мет)акриламид получают в результате биокаталитической реакции или ферментативного процесса, и в котором биокатализатор включает фермент нитрилгидратазу, где водный раствор (мет)акриламида содержит клеточный материал и/или компоненты ферментативного бульона, при котором, по существу, не происходит удаления клеточного материала и/или компонентов ферментативного бульона из водного раствора (мет)акриламида.

2. Способ по п.1, в котором (мет)акриламид получают из (мет)акрилонитрила, который может быть конвертирован в (мет)акриламид путем контактирования (мет)акрилонитрила с биокатализатором, который включает микроорганизм или клеточный материал, и таким образом превращения субстрата в (мет)акриламид, содержащий клеточный материал и необязательно компоненты ферментации, и этот способ осуществляют внутри или вне клетки.

3. Способ по п.2, в котором биокатализатор включает микроорганизм, и в котором способ осуществляется внутри клетки, где он составляет часть метаболического процесса микроорганизма.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором клеточный материал содержит целые клетки.

5. Способ по любому из пп.1-3, в котором клеточный материал включает разрушенный клеточный материал.

6. Способ по п.5, в котором разрушенный клеточный материал выбирают из группы, состоящей из стенок клеток, клеточных мембран, клеточных ядер, цитоплазмы и белков.

7. Способ по любому из пп.1-3, в котором компоненты ферментативного бульона выбирают из группы, состоящей из сахаров, полисахаридов, белков, пептидов, аминокислот, источников азота, неорганических солей (в том числе солей металлов), витаминов, регуляторов роста, индукторов ферментов и компонентов сложной ферментативной среды, таких как жидкий кукурузный экстракт и дрожжевой экстракт.

8. Способ по п.1, в котором полимер является гомополимером или сополимером (мет)акриламида.

9. Способ по п.2, в котором (мет)акрилонитрил помещают в сосуд и приводят в контакт с указанным биокатализатором, и в котором (мет)акрилонитрил превращают в (мет)акриламид, необязательно вводя в сосуд другие мономеры с образованием мономерной смеси, и помещают (мет)акриламид или смесь мономеров в условия полимеризации, необязательно вводя в сосуд инициаторы.

10. Способ по п.9, в котором биокатализатор готовят в сосуде.

11. Способ по п.2 или 3, в котором биокатализатор включает микроорганизмы *Rhodococcus* genus, предпочтительно *Rhodococcus rhodochrous*.

12. Способ по п.11, в котором микроорганизм представляет собой *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164.

13. Композиция для применения в качестве флокулянтов, включающая полимер для получения полимера (мет)акриламида и клеточный материал и/или компоненты ферментативного бульона, причем композицию получают способом по любому из пп.1-12.