

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246731 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **439742**

(22) Data zgłoszenia: **2021.12.05**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.06.12 BUP 24/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.03.03 WUP 09/2025**

(51) MKP:

C12P 7/42 (2006.01)

C08F 2/04 (2006.01)

B01D 21/26 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Warszawski, Warszawa, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

ŁUKASZ DZIEWIT, Warszawa, PL

MICHAŁ STYCZYŃSKI, Warszawa, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Rożkowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób otrzymywania wysoko oczyszczonego polimeru kwasu homogenizacyjnego

PL 246731 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania wysoko oczyszczonego polimeru kwasu homogentyzynowego (piomelaniny).

Kwas homogentyzynowy, nazywany inaczej kwasem 2,5-dihydroksyfenylooctowym lub alkaptonem, powstaje w wyniku metabolizmu L-tyrozyny i jest pochodną hydrochinonu. Charakterystyczną cechą chinonów jest natomiast duża reaktywność i szybki cykl redoks.

Piomelanina jest to naturalny polimer kwasu homogentyzynowego wytwarzany przez bakterie, grzyby i rośliny. W naturze piomelanina służy organizmom do ochrony przed promieniowaniem UV oraz do wychwytywania wolnych rodników. Ponadto, posiada zdolność do redukcji żelaza i jego biokoncentracji, co może być przystosowaniem w przypadku jego niedoborów w środowisku. Polimer kwasu homogentyzynowego jest stosunkowo reaktywnym związkami. Jego aktywność przypomina w pewnym zakresie oddziaływanie kwasów humusowych z substancjami obecnymi w glebie.

Z publikacji literaturowej autorów Huda M. Mahmood, Alaa K. Mohammed, May T. A Flayyih pt. „Purification and physicochemical characterization of pyomelanin pigment produced from local *Pseudomonas aeruginosa* isolates” znany jest sposób ekstrakcji i oczyszczania piomelaniny polegający na wyizolowaniu szczepu bakteryjnego zdolnego do wytwarzania dużych ilości piomelaniny na pożywce do produkcji piomelaniny uzupełnionej L-tyroziną. Próbkę zamrożono i rozmrożono w celu wyekstrahowania pigmentu piomelaniny, a następnie zakwaszono do pH 2 i odstawiono na jeden tydzień w temperaturze pokojowej. Następnie zawiesinę gotowano przez 1 godzinę, aby zapobiec tworzeniu się melanoïdyn, po czym odwirowano przy 8000 g przez 10 minut. Wytworzony pigment przemywano trzykrotnie 15 ml 0,1 M HCl, a następnie przemywano wodą. Do osadu dodano 10 ml etanolu i mieszaninę inkubowano we wrzącej łaźni wodnej przez 10 min, po czym utrzymywano w temperaturze pokojowej przez 1 dzień. Następnie osad przemywano dwukrotnie etanolem, po czym suszono na powietrzu.

Z publikacji literaturowej autora Sinan Bayram pt. „Production, purification, and characterization of *Streptomyces* sp. strain MPPS2 extracellular pyomelanin pigment” znany jest sposób bioprodukcji i oczyszczania piomelaniny. Szczep MPPS2 sp. zainokulowano pożywką. W tym celu przygotowano 150 ml sterylnej pożywki w 250 ml kolbach i inokulowane próbki inkubowano na wytrząsarce orbitalnej przez tydzień (200 obr./min, 35°C). Pod koniec 1-tygodniowego okresu inkubacji, brązowo zabarwioną pożywkę przeniesiono do 50 ml probówek i wirowano przy 10 000 obr./min przez 10 minut. Proces wirowania powtórzono trzy razy. Następnie dostosowano pH próbek bez biomasy bakteryjnej do wartości 2 przy użyciu 6 M HCl. Otrzymane próbki pozostawiono do polimeryzacji przez 24 h w ciemnym otoczeniu w temperaturze pokojowej. Pod koniec procesu polimeryzacji próbki ponownie wirowano przy 10 000 obr./min przez 10 min. Po odwirowaniu ostrożnie zdekantowano supernatant. Otrzymane „pelety” suszono w piecu w temperaturze 55°C przez 24 godziny. Oczyszczona i spolimeryzowana melanina została przeniesiona do probówek Eppendorfa i przechowywana w temperaturze -20°C.

Z publikacji literaturowej autorów Macarena Larroude, Djamilia Onésime, Olivier Rué, Jean-Marc Nicaud, Tristan Rossignol pt. „A *Yarrowia lipolytica* strain engineered for pyomelanin production” znany jest sposób otrzymywania i oczyszczania piomelanin. Szczepy *E. coli* hodowano w 37°C na pożywce Luria-Bertani (10 g/l tryptonu, 5 g/l ekstraktu drożdżowego i 10 g/l NaCl) zawierającego 100 g/l ampicyliny lub 50 g/l. Szczepy *Y. lipolytica* hodowano w 28°C w minimalnej pożywce YNB zawierającej 10 g/l glukozy, 1,7 g/l drożdżowej zasady azotowej, 5 g/l NH₄Cl i 50 mM buforu fosforanowego (pH 6,8) lub w bogatej pożywce YPD zawierającej 10 g/L glukozy, 10 g/L peptonu i 10 g/L ekstraktu drożdżowego. Dodano uracyl (100 mg/L) i leucynę (700 mg/L), aby spełnić wymagania szczepów auktotroficznych, a w celu selekcji szczepów dodano higromycynę B (250 mg/l) lub nourseotrycynę (400 mg/l). Szczepy *Y. lipolytica* hodowano wstępnie przez noc w 5 ml pożywki YPD (28°C, 80 rpm). Hodowle wstępne następnie odwirowano, przemyto dwukrotnie sterylną wodą destylowaną i zastosowano do zaszczepienia 15 ml pożywki YNB w 100 ml kolbach (OD₆₀₀ 0,05). Komórki hodowano w 28°C z mieszaniem (180 rpm) przez okres do 25 dni. Co 2–3 dni hodowle oceniano wizualnie w celu monitorowania wyglądu brązowego pigmentu. Próbkę odwirowano, a supernatanty zastosowano do analizy HPLC lub ekstrakcji piomelaniny. Ekstrakcja polegała na tym, że hodowle odwirowano (10000 g przez 15 min) i melaninę oczyszczono z supernatantu przez zakwaszenie (dodawano 1 M HCl aż do osiągnięcia pH ~2), co spowodowało wytrącanie piomelaniny. Po 24 h w temperaturze pokojowej powstałe próbki odwirowano (10000 g przez 10 min). Otrzymano brązowe „pelety”, które przemyto i liofilizowano.

Celem wynalazku jest uzyskanie wysoko oczyszczonej, pozbawionej reszt organicznych piomelaniny. Celem wynalazku jest opracowanie szybkiego i wydajnego sposobu otrzymywania piomelaniny.

Celem wynalazku jest również zapewnienie uniwersalnej metody, która pozwala na izolację polimeru z różnych typów brzeczek pochodowlanych.

Cel ten zrealizowano w przedmiotowym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania wysoko oczyszczonego polimeru kwasu homogentyzynowego, w którym:

- (a) wstępnie oczyszcza się kwas homogentyzynowy oddzielając kwas homogentyzynowy od komórek mikroorganizmów produkujących kwas homogentyzynowy i części makrocząstek w serii wirowań brzeczeki pochodowlanej w obniżonej temperaturze, a następnie filtruje się roztwór z zastosowaniem dwumembranowych filtrów, przy czym wstępne oczyszczanie prowadzi się w próżni lub atmosferze gazu obojętnej;
- (b) polimeryzuje się kwas homogentyzynowy do piomelaniny dodając do roztworu otrzymanego w etapie a) H_2O_2 , następnie roztwór alkalizuje się do pH nie wyższego niż 8,5, roztwór wytrząsa się a następnie zakwasza do pH 2 i inkubuje się w warunkach podwyższonej temperatury i ciśnienia,
- (c) izoluje się polimer otrzymany w etapie b) stosując sekwencję płukań i odwirowywania zestawem roztworów w warunkach obniżonej temperatury.

Korzystnie, w etapie a) wirowanie prowadzi się przez 5 minut przy prędkości 5500 RCF w temp. 4°C , następnie uzyskany supernatant przefiltruje się przez dwumembranowy układ filtrów, po czym przefiltrowany supernatant odwirowuje się z maksymalną prędkością wirówki, korzystnie około 20000 RCF, przez 10 minut.

Korzystnie, wirowanie w etapie a) prowadzi się na filtrach $0,22\ \mu\text{m}$ i $0,45\ \mu\text{m}$ z polifluorku winylidenu.

Korzystnie, po zakończeniu wirowania i filtracji w etapie a) supernatant dekantuje się znad osadu.

Korzystnie, do uzyskanego w etapie a) roztworu zawierającego kwas homogentyzynowy wprowadza się 1% (obj./obj.) perhydrolu ($30\% \text{H}_2\text{O}_2$) lub 10% (obj./obj.) wody utlenionej ($3\% \text{H}_2\text{O}_2$).

Korzystnie, roztwór alkalizuje się NaOH.

Korzystnie, roztwór w etapie b) wytrząsa się przez 30 min przy prędkości co najmniej 150 rpm w temperaturze 25°C .

Korzystnie, roztwór w etapie b) po zakwaszeniu, korzystnie HCl, inkubuje się przez 30 min w temperaturze 121°C i pod ciśnieniem 100–120 kPa.

Korzystnie, po zakończeniu inkubacji roztwór w etapie b) schładza się, korzystnie do temperatury 4°C .

Korzystnie, zestaw roztworów, którym płucze się polimer otrzymany w etapie b) stanowi woda podwójnie destylowana ($18\ \text{M}\Omega\text{-cm}$) o pH minimum 2, 96% etanol i woda destylowana o pH 8,5.

Korzystnie, w etapie c) odwirowania roztworu z precypitatem prowadzi się przez 5 min przy prędkości 20000 RCF w temperaturze 4°C .

Rozwiązanie wg wynalazku pozwala na eliminację większości zbędnej materii organicznej już na etapie wstępnego oczyszczania. Znane rozwiązania nie uwzględniają tego, że kwas homogentyzynowy po utlenieniu i polimeryzacji do piomelaniny może osiągać masę nawet 50 tysięcy daltonów i tym samym stanowić istotną frakcję odwirowanego peletu. Przedmiotowy wynalazek ogranicza przedwczesną polimeryzację kwasu homogentyzynowego do piomelaniny, zwiększając tym samym późniejszą wydajność jej ekstrakcji. Cykl wirowań o specyficznym dobranych parametrach oraz filtracja przez dwumembranowe filtry pozwala na oddzielenie większości makrocząstek od kwasu homogentyzynowego znajdującego się w roztworze.

Rozwiązanie wg wynalazku obejmuje również przyspieszenie polimeryzacji kwasu homogentyzynowego do piomelaniny. Znane rozwiązania bazują na wykorzystaniu specyficznych enzymów i/lub związków utleniających, które stają się jednocześnie źródłem zbędnych zanieczyszczeń w próbce. Sposób wg wynalazku uwzględnia dodanie nadtlenu wodoru do roztworu zawierającego kwas homogentyzynowy a następnie ogrzaniu zawartości pod zwiększonym ciśnieniem. Niniejszy sposób nie generuje zbędnych produktów i jest ekonomiczny.

Ostatnim elementem wynalazku jest wydajna izolacja polimeru z roztworu. Piomelanina jest związkiem bardzo polarnym i stabilnym w szerokim spektrum temperatur i pH. Przedmiotowy wynalazek obejmuje wstępne usunięcie zanieczyszczeń poprzez sekwencję wirowań i filtracji, a następnie przeprowadzenie hydrolizy kwasowej w określonych warunkach ciśnienia i temperatury w celu usunięcia innych niepożądanych związków. Uzyskany precypitat jest następnie odwirowywany, a pelet jest kilkakrotnie przepłukiwany odpowiednim zestawem roztworów.

Znane rozwiązania obejmują zwykle bezpośrednią precypitację polimeru z podczyszczonego płynu pochodowlanego.

Zgodnie ze sposobem wg wynalazku na etapie a) ustala się parametry wirowania. Wstępne oczyszczenie kwasu homogentyzynowego prowadzi się z zastosowaniem dwumembranowych filtrów i próżni lub atmosfery gazu obojętnego.

Zastosowanie obniżonej temperatury przy wirowaniu 5500 RCF w czasie 5 minut nie prowadzi do pęknięcia komórek bakteryjnych i wydostania się ich drobnocząsteczkowej zawartości do roztworu, a niska temperatura kompensuje ograniczoną szybkość obrotów i jest czynnikiem wpływającym na koagulację zanieczyszczeń. Powyższa procedura ogranicza kontaminację kwasu homogentyzynowego.

Wykorzystuje się dwumembranowy zestaw filtrów w celu zmniejszenia ryzyka kontaminacji roztworu z kwasem homogentyzynowym ponieważ zmniejszone ciśnienie przy filtracji również ogranicza pękanie komórek bakteryjnych i zapobiega zanieczyszczeniu frakcji zawierającej kwas homogentyzynowy.

Zastosowanie warunków próżniowych lub atmosfery gazu obojętnego ogranicza przedwczesną reakcję polimeryzacji i zwiększa wydajność późniejszej ekstrakcji związku.

W sposobie wg wynalazku na etapie b) przyspiesza się polimeryzację kwasu homogentyzynowego, która nie prowadzi do jego dodatkowej kontaminacji jonami metali lub białkami (enzymami) oraz nie wpływa negatywnie na jego strukturę. Podwyższone ciśnienie i temperatura są natomiast kluczowym etapem przyspieszającym polimeryzację do piomelaniny.

Zastosowanie obojętnych dla kompozycji roztworu utleniaczy w postaci nadtlenku wodoru (H_2O_2) nie zanieczyszcza próbki i nie wpływa negatywnie na strukturę piomelaniny. Powszechnie stosowane utleniacze, np. sole manganu (Mn^{2+}) lub miedzi (Cu^{2+}) mogą zanieczyszczać próbkę i wiązać się z polimerem.

Wytrząsanie (30 min, min. 150 rpm, 25°C) roztworu zawierającego 1% (obj./obj.) perhydrołu (30% H_2O_2) lub 10% (obj./obj.) wody utlenionej (3% H_2O_2) i pH 8,5 stanowi nową i nieoczywistą a także sprawdzoną eksperymentalnie metodę polimeryzacji kwasu homogentyzynowego.

Zakwaszenie roztworu do pH 2 oraz inkubacja 30 min w temperaturze 121°C w warunkach podwyższonego ciśnienia (100–120 kPa) jest krytycznym punktem przyspieszenia procesu polimeryzacji kwasu homogentyzynowego i hydrolizy ewentualnych zanieczyszczeń organicznych. Pasywny proces polimeryzacji zajmuje tydzień (Sajjan, S., Kulkarni, G., Yaligara, V., Lee, K., & Karegoudar, T. B. (2010). Purification and physiochemical characterization of melanin pigment from *Klebsiella* sp. GSK. Journal of microbiology and biotechnology, 20(11), 1513–1520; Singh, D., Kumar, J., & Kumar, A. (2018).

W rozwiązaniu wg wynalazku zastosowano sekwencję płukań mających na celu usunięcie pozostałych zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych. W rozwiązaniu zastosowano również obniżoną temperaturę w całym procesie doczyszczania, co ogranicza to utratę polimeru na etapach wirowania i zapobiega ewentualnym reakcjom estryfikacji.

Dzięki sekwencji płukania i odwirowywania polimeru zakwaszonego do pH minimum 2 w temperaturze 4°C nie ma istotnej utraty metabolitu (piomelaniny) podczas etapów doczyszczania związku.

Sekwencja płukania i odwirowywania polimeru zawieszzonego w 96% etanolu w temperaturze 4°C pozwala na doczyszczanie związku z dodatkowych zanieczyszczeń organicznych – piomelanina nie rozpuszcza się w etanolu. Obniżona temperatura zapobiega ew. reakcjom estryfikacji.

Głównym atutem przedmiotowego wynalazku jest optymalizacja trzech etapów pozyskiwania polimeru kwasu homogentyzynowego. Przewagą przedmiotowej metody wstępnego oczyszczania brzezki pochodowlanej zawierającej kwas homogentyzynowy nad powszechnie stosowanymi sposobami jest pozbycie się maksymalnie dużej ilości zanieczyszczeń. Standardową metodą jest bezpośrednie odwirowanie bakterii (przy prędkości ok. 11200 RCF), zakwaszenie próbki i precypitacja związku po upływie tygodnia (Sajjan, S., Kulkarni, G., Yaligara, V., Lee, K., & Karegoudar, T. B. (2010). Purification and physiochemical characterization of melanin pigment from *Klebsiella* sp. GSK. Journal of Microbiology and Biotechnology, 20(11), 1513–1520; Singh, D., Kumar, J., & Kumar, A. (2018). Isolation of pyomelanin from bacteria and evidences showing its synthesis by 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase enzyme encoded by *hppD* gene. International Journal of Biological Macromolecules, 119, 864–873). Na tym etapie dochodzi do uszkodzenia komórek bakteryjnych, wydostania się ich zawartości do roztworu i dodatkowej kontaminacji próbki. Dodatkowo zachodzi wiele reakcji chemicznych, które w różnym stopniu mogą modyfikować związek. Technika opisana w wynalazku pozwala na uniknięcie dodatkowej kontaminacji i znacznie zwiększa wydajność i szybkość otrzymania polimeru kwasu homogentyzynowego.

Proces polimeryzacji przeprowadzany jest zwykle pasywnie lub przy pomocy jonów manganu (Mn^{2+}) i miedzi (Cu^{2+}) (Lorquin, F., Ziarelli, F., Amouric, A., Di Giorgio, C., Robin, M., Piccerelle, P., & Lorquin, J. (2021). Production and properties of non-cytotoxic pyomelanin by laccase and comparison to bacterial and synthetic pigments. *Scientific reports*, 11(1), 1–16) i alkalizacji roztworu (Zeng, Z. Guo, X. P., Cai, X., Wang, P., Li, B., Yang, J. L., & Wang, X. (2017). Pyomelanin from *Pseudoalteromonas lipolytica* reduces biofouling. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1718–1731). Dodatek jonów stanowi jednak dodatkową frakcję zanieczyszczeń, a co więcej mogą się one wiązać do powierzchni polimeru (Turick, C. E., Knox, A. S., Becnel, J. M., Ekechukwu, A. A., & Milliken, C. E. (2010). Properties and function of pyomelanin. *Biopolymers*, 449, 72) i tym samym utrudnić ich usunięcie w trakcie dalszych procesów oczyszczania. Alkalizacja powyżej pH 10–11 prowadzić może natomiast do niepożądanych i nieodwracalnych reakcji (Guin, P. S., Das, S., & Mandal, P. C. (2011). Electrochemical reduction of quinones in different media: a review. *International Journal of Electrochemistry*, 2011).

Sposób wg wynalazku polegający na wprowadzeniu roztworu H_2O_2 ; alkalizacji roztworu do pH 8,5; oraz wytrząsaniu przez określony czas nie zanieczyszcza oraz nie modyfikuje struktury piomelaniny.

Przedstawiony w wynalazku etap ostatecznego doczyszczenia polimeru pozwala na uzyskanie związku o minimum 95% stopniu czystości bez wykorzystania technik chromatograficznych. Sekwencja doczyszczenia związku zakwaszoną wodą oraz etanolem w obniżonej temperaturze ($4^\circ C$) jest eksperymentalnie potwierdzoną i skuteczną metodą usuwania dodatkowych zanieczyszczeń.

Ze względu na szerokie spektrum właściwości piomelaniny, zastosowanie procesu wg wynalazku pozwoli na jej wtórne wykorzystanie w wielu gałęziach przemysłu, m.in. w kosmetologii, czy w hydrometalurgii.

Przykład

Etap a). Wstępne oczyszczanie próbki:

Brzeczkę pohodowlaną należy odwirować przez 5 min/5500 RCF w temperaturze $4^\circ C$ (lub niższej). Odpowiednia temperatura i prędkość obrotów umożliwiają oddzielenie większości komórek mikroorganizmów od roztworu z kwasem homogentyzynowym. Dodatkowo, obniżona temperatura również jest czynnikiem koagulującym, np. w przypadku związków o charakterze lipowym. Uzyskany supernatant należy następnie przefiltrować przez dwumembranowy układ filtrów ($0,22 \mu m$ i $0,45 \mu m$; z polifluorku winylidenu), dzięki czemu możliwe jest zastosowanie korzystnej wartości ciśnienia do filtracji, co dalej zmniejsza ryzyko kontaminacji. Przefiltrowany supernatant należy następnie odwirować z maksymalną prędkością wirówki (zalecane około 20000 RCF) przez 10 minut. Wirowanie należy przeprowadzać w próżni lub w atmosferze gazu obojętnego w celu ograniczenia przedwczesnej polimeryzacji kwasu homogentyzynowego. Uzyskany supernatant należy zdekantować z nad powierzchni osadu.

Etap b). Przyspieszenie procesu polimeryzacji:

Do uzyskanego w etapie a) roztworu zawierającego kwas homogentyzynowy należy wprowadzić 1% (obj./obj.) perhydrolu ($30\% H_2O_2$) lub 10% (obj./obj.) wody utlenionej ($3\% H_2O_2$) – nadtlenuk wodoru nie zmienia kompozycji roztworu. Po wprowadzeniu czynnika utleniającego, preparat należy zalkalizować roztworem NaOH do pH maksymalnie 8,5. Dzięki temu hydrochinony zostaną przekształcone do rozpuszczalnych chinonów, co zwiększa ich rozpuszczalność i ułatwia polimeryzację. Roztwór należy następnie wytrząsać przez 30 min (min. 150 rpm) w temperaturze $25^\circ C$. Po upływie czasu preparat należy zakwasić roztworem HCl do pH minimum 2, a następnie inkubować 30 min w temperaturze $121^\circ C$ w warunkach podwyższonego ciśnienia (100–120 kPa). Po upływie czasu roztwór należy schłodzić do temperatury $4^\circ C$. Wytrącony precypitat świadczy o obecności polimerów (min 10 kDa) kwasu homogentyzynowego.

Etap c). Izolacja polimeru:

Roztwór z uzyskanym precypitatem (etap b) należy odwirować przez 5 min/20000 RCF w temperaturze $4^\circ C$. Uzyskany supernatant należy zdekantować, a osad zawiesić w wodzie podwójnie destylowanej ($18 M\Omega \cdot cm$) o pH minimum 2 (zakwaszona roztworem HCl). Próbkę należy odwirować przez 5 min/20000 RCF w temperaturze $4^\circ C$, zlać supernatant i ponownie wspomniany proces zawieszania i wirowania jeszcze dwukrotnie w celu doczyszczenia preparatu. Osad należy następnie zawiesić w etanolu 96% i zwirować 5 min/20000 RCF w temperaturze $4^\circ C$. Supernatant należy zlać z nad osadu, a proces zawieszania w etanolu i wirowania powtórzyć jeszcze dwukrotnie. Na koniec precypitat należy zawiesić w wodzie destylowanej ($18 M\Omega \cdot cm$) o pH 8,5 i wykonać dializę (z odcięciem masy cząsteczkowej do 10 kDa) w celu odsolenia i ostatecznego doczyszczenia próbki.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania wysoko oczyszczonego polimeru kwasu homogentyzynowego, **znamienny tym**, że
 - (a) wstępnie oczyszcza się kwas homogentyzynowy oddzielając kwas homogentyzynowy od komórek mikroorganizmów produkujących kwas homogentyzynowy i części makrocząstek w serii wirowań brzezki pohodowlanej w obniżonej temperaturze, a następnie filtruje się roztwór z zastosowaniem dwumembranowych filtrów, przy czym wstępne oczyszczanie prowadzi się w próżni lub atmosferze gazu obojętnego;
 - (b) polimeryzuje się kwas homogentyzynowy do piomelaniny, dodając do roztworu otrzymanego w etapie a) H_2O_2 , następnie roztwór alkalizuje się do pH nie wyższego niż 8,5, roztwór wytrząsa się a następnie zakwasza do pH 2 i inkubuje się w warunkach podwyższonej temperatury i ciśnienia,
 - (c) izoluje się polimer otrzymany w etapie b) stosując sekwencję płukań i odwirowywania zestawem roztworów w warunkach obniżonej temperatury
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie a) wirowanie prowadzi się przez 5 minut przy prędkości 5500 RCF w temp. 4°C , następnie uzyskany supernatant przefiltrowuje się przez dwumembranowy układ filtrów, po czym przefiltrowany supernatant odwirowuje się z maksymalną prędkością wirówki, korzystnie około 20000 RCF, przez 10 minut.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że wirowanie w etapie a) prowadzi się na filtrach $0,22\ \mu\text{m}$ i $0,45\ \mu\text{m}$ z polifluorku winylidenu.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że po zakończeniu wirowania i filtracji w etapie a) supernatant dekantuje się z nad osadu.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do uzyskanego w etapie a) roztworu zawierającego kwas homogentyzynowy wprowadza się 1% (obj./obj.) perhydrolu (30% H_2O_2) lub 10% (obj./obj.) wody utlenionej (3% H_2O_2).
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że roztwór alkalizuje się NaOH.
7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że roztwór w etapie b) wytrząsa się przez 30 min przy prędkości co najmniej 150 rpm w temperaturze 25°C .
8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że roztwór w etapie b) po zakwaszeniu, korzystnie HCl, inkubuje się przez 30 min w temperaturze 121°C i pod ciśnieniem 100–120 kPa.
9. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że po zakończeniu inkubacji roztwór w etapie b) schładza się, korzystnie do temperatury 4°C .
10. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zestaw roztworów, którym płucze się polimer otrzymany w etapie b) stanowi woda podwójnie destylowana ($18\ \text{M}\Omega\text{-cm}$) o pH minimum 2, 96% etanol i woda destylowana o pH 8,5.
11. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie c) odwirowania roztworu z precypitatem prowadzi się przez 5 min przy prędkości 20000 RCF w temperaturze 4°C .