



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

231 656

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 10 05 82
(21) PV 3339-82

(51) Int. Cl.
C 12 N 11/08

(40) Zveřejněno 29 07 83
(45) Vydáno 01 05 86

(75)
Autor vynálezu

VOJTÍŠEK VLADIMIR RNDr.CSc.,
BARTA MIROSLAV RNDr.,
JIRKU VLADIMIR RNDr.CSc.,
KRUMPHANZL VLADIMIR prof.ing.DrSc.,
ČULÍK KAREL RNDr., PRAHA

(54)

Enzymové katalyzátory pro biotransformace
a způsob jejich výroby

Vynález se týká enzymových katalyzátorů pro biotransformace na bázi imobilizovaných enzymů mikrobiálního, živočišného a rostlinného původu a způsobu jejich výroby. Enzymové katalyzátory získané postupem podle vynálezu sestávají z různých enzymů o různé čistotě, s výhodou technických nebo surových enzymových preparátů, nesoucí zejména hydrolázovou, izomerázovou, lyázovou nebo racemázovou aktivitu, které jsou imobilizovány chemicky reaktivním polymerem rozpustným ve vodě, vzniklým reakcí ve vodě rozpustné látky, obsahující nejméně dvě primární a/nebo sekundární aminogrupy, jako například polyethylemin, hexamethyldiamin, lysin a polylysin s bifunkčními aldehydy dikarboxylových kyselin, jako je například glutaraldehyd. Vzniklé ve vodě nerozpustné částice imobilizovaných enzymů se dále různým způsobem zpevňují s cílem získání dobře sedimentujících částic s dobrými mechanickými a hydrodynamickými vlastnostmi a vysokou specifickou aktivitou požadovaného enzymu. Způsob výroby imobilizovaných enzymů nevyžaduje žádných organických syntetických, anorganických či přírodních ve vodě nerozpustných nosičů, čímž podstatným způsobem zjednodušuje výrobu těchto katalyzátorů. Enzymové katalyzátory jsou využitelné pro průmyslové biotransformace a umožňují vykonávat diskontinuální opakované nebo kontinuální biotechnologie výroby farmaceuty, potravinářsky či zemědělsky významných produktů či meziproduktů.

Vynález se týká enzymových katalyzátorů pro biotransformace na bázi imobilizovaných enzymů mikrobiálního, živočišného a rostlinného původu a způsobu jejich výroby. Enzymové katalyzátory získané postupem podle vynálezu sestávají z různých enzymů o různé čistotě, s výhodou technických nebo surových enzymových preparátů, nesoucí zejména hydrolázovou, izomerázovou, lyázovou nebo racemázovou aktivitu, které jsou imobilizovány chemicky reaktivním polymerem rozpustným ve vodě, vzniklým reakcí ve vodě rozpustné látky, obsahující nejméně dvě primární a/nebo sekundární aminoskupiny, jako je například polyethylenimin, hexamethylen-diamin, lysin a polylysin s bifunkčními aldehydy dikarboxylových kyselin, jako je například glutaraldehyd. Vzniklé ve vodě nerozpustné částice imobilizovaných enzymů se dále různým způsobem zpevňují s cílem získání dobře sedimentujících částic s dobrými mechanickými a hydrodynamickými vlastnostmi a vysokou specifickou aktivitou požadovaného enzymu. Způsob výroby imobilizovaných enzymů nevyžaduje žádných organických syntetických, anorganických či přírodních ve vodě nerozpustných nosičů, čímž podstatným způsobem ekonomizuje výrobu těchto katalyzátorů. Enzymové katalyzátory jsou využitelné pro průmyslové biotransformace a umožňují vypracovat diskontinuální opakované nebo kontinuální biotechnologie výroby farmaceuticky, potravinářsky či zemědělsky významných produktů či meziproduktů.

Vynález se týká enzymových katalyzátorů pro biotransformace na bázi imobilizovaných enzymů mikrobiálního, živočišného či rostlinného původu a způsobu jejich výroby.

Enzymové katalyzátory podle vynálezu jsou využitelné pro průmyslové biotransformace, resp. umožňují vypracovat diskontinuální nebo kontinuální biotechnologie výroby farmaceuticky, potravinářsky či zemědělsky významných produktů či meziproduktů.

Znamé způsoby imobilizace enzymů lze obecně charakterizovat jako fyzikální např. sorpce a inkluze, fyzikálně chemické např. polární vazba a chemické např. kovalentní vazba. K tomuto účelu se používá různých ve vodě nerozpustných syntetických nebo přírodních organických či anorganických materiálů jako nosičů požadované enzymové aktivity. Souhrnně jsou tyto postupy pro vazbu enzymů podrobně zmíněny například v monografiích *Immobilized Enzymes* /edit. O. Zaborsky, CRC Press, A Division of the Chemical Rubber Co., USA Cleveland, Ohio, 1974/, *Immobilized Enzymes for Industrial Reactors* /edit. R.A. Messing, Acad. Press New York, San Francisco, London, 1975/, *Insolubilized Enzymes* /edit. M. Salmona, C. Saronia, S. Garattini, Raven Press, New York, 1974/ a *Industrial Enzymes, Recent Advances* /J.C. Johnson, Noyes Data Corporation, Park Ridge, New Jersey, Chemical Technology Review No. 85, USA, 1977/. Jako nosičů pro imobilizaci enzymů je využívána řada syntetických organických inertních či chemicky aktivních polymerů získaných cíleně vedenou polymerací např. na bázi methakrylaldehydu, glycidylmethakrylátu, hydroxyalkylmethakrylátu, přírodních polymerů např. celulózy a jejích derivátů, anorganických materiálů např. skla apod.

Nosiče těchto a podobných typů jsou většinou nákladné přípravy, jejichž cena a dostupnost a jejich případná předchozí modifikace a aktivace různými činidly, limitují přípravu a využití imobilizovaných enzymů. Z uvedených důvodů, zvláště z hlediska průmyslového využití imobilizovaných enzymů, se v posledních několika letech projevuje jak v odborné tak patentové literatuře tendence přecházet od více či méně definovaných nosičů na bázi syntetických polymerů nebo porézního skla k materiálům méně nákladným. Z ekonomicky přijatelného hlediska se zdají být přitažlivé různé přírodní materiály, zejména chitin, kolagen a především odpadní biomasa po různých fermentačních výrobcích, jejíž cena je převážně nulová. Jde zejména o odpadní kvasinky po výrobě piva, odpadní mycelium po výrobě penicilinu apod., tedy o odpadní buň-

ky různých mikroorganismů, které lze použít jako nerozpustných nosičů pro převážně kovalentní nebo koordinačně kovalentní vazbu enzymů na povrch jednotlivých buněk či buněčných agregátů.

I v Československé odborné a především patentové literatuře lze v posledních několika letech sledovat posun zájmu vynucený ekonomizací výroby například vypracováním postupu imobilizace enzymu penicilinacylázy pro výrobu 6-aminopenicilánové kyseliny na povrch různým způsobem ošetřených či nativních mikrobiálních buněk či jejich fragmentů pomocí bifunkčních aldehydů, zejména glutaraldehydu, za tvorby vzájemně kovalentně prokřížené sítě imobilizovaného enzymu spolu s buňkami majícími charakter nerozpustného nosiče, podle čs. autorského osvědčení č. 208 931. Podobný způsob, avšak na rozdíl od předchozího způsobu využívající flokulace enzymu s buňkami majícími charakter nosiče a to flokulanty vstupujícími do reakce s bifunkčními aldehydy, je popsán pro imobilizaci enzymu amyloglukosidázy v čs. autorském osvědčení č. 216 634

příčemž využití tohoto katalyzátoru pro výrobu glukózy a dalších produktů její enzymové přeměny ze škrobu je popsáno v čs. autorském osvědčení č. 216 646

Stejně tak je popsáno kovalentní zesíťení různých enzymů pomocí různých bi-resp. polyfunkčních činidel, zejména glutaraldehydu nebo toluendiisokynátu za vzniku ve vodě nerozpustné kovalentně prokřížené sítě enzymově aktivních bílkovin /Jansen E.F. a Olson, A.C; Arch.Biochem.Biophys. 129, 221, 1969/. Tyto postupy nevyžadují ve vodě nerozpustné nosiče vůbec. Na rozdíl od předchozích postupů /vazba na povrchy buněk/, poskytuje posléze zmíněný postup nižší výtěžky imobilizovaného enzymu a obvykle se tyto preparáty vyznačují nižší stabilitou imobilizované enzymové aktivity. Zesíťení enzymů pomocí zmíněných velmi reaktivních síťovacích činidel vede často k značné případně úplné inaktivaci enzymové aktivity. K potlačení silné inaktivace enzymové aktivity při síťení enzymů např. glutaraldehydem se používá konkurenční reakce s přídatnou bílkovinou např. albuminem v průběhu reakce síťení požadovaného enzymu, popřípadě síťení v přítomnosti diaminů např. hexamethylendiaminu /Avrameas, S., Immunochemistry 6, 43, 1969/.

Zvláštním případem je pak využití ve vodě rozpustných chemicky inertních či chemicky reaktivních polymerů, kdy v prvním případě se jedná např. o sorpci rozpuštěného enzymu na ve vodě rozpustný polymer, čímž se vytvoří stabilizovaný ve vodě rozpustný

komplex enzym/polymer, ve druhém případě se ve vodě rozpustný polymer chemicky aktivuje a po jeho aktivaci se smísí s enzymem, čímž dojde ke kovalentní vazbě enzymu na aktivovaný polymer za vzniku chemicky stabilizovaného avšak ve vodě rozpustného enzymu. Příkladem přípravy stabilizovaných ve vodě rozpustných enzymů je glycerolkináza sorbovaná na dextran /USA patentový spis č. 3,962 037/ nebo kovalentně vázaná penicilinacyláza na kyanobromidem aktivovaný ve vodě rozpustný dextran /NSR DOS 2,312 824/ či tentýž enzym kovalentně vázaný na ve vodě rozpustné kopolymery malein-ahydridu s vinylmethyl etherem, ethylenem, styrenem nebo vinylacetátem. Rovněž je popsán způsob chemické aktivace bílkovin například albuminu glutaraldehydem za vzniku ve vodě rozpustné chemicky aktivní bílkoviny /Attalla a Hultin, J.Food.Sci., 42, 7, 19777/. Při využití posléze zmíněných postupů rezultují imobilizované avšak ve vodě rozpustné enzymy, přičemž imobilizované enzymy tím, že zůstávají ve vodě rozpustné nelze využít pro průmyslové biotransformace běžnými typy reaktorů, jejichž využití je omezeno na speciální typy ultrafiltračních reaktorů, což je spojeno se značnými nároky na aparaturní vybavení. Tohoto způsobu imobilizace se v převážné většině případů používá ke stabilizaci enzymů pro analytickou a klinicko-diagnostickou praxi.

Zjistili jsme v nedávné době, že lze připravit buněčné katalyzátory využitelné pro biotransformace na bázi imobilizovaných prokaryontních či eukaryontních buněk různých druhů mikroorganismů a rostlinných buněk obsahujících různé enzymy pomocí reaktivních ve vodě rozpustných polymerů podle čs. autorského osvědčení č. 231458 přičemž resultující částice imobilizovaných buněk se vyznačují velmi dobrými sedimentačními vlastnostmi, vysokou specifickou aktivitou a vysokým výtěžkem imobilizace. Tento postup byl aplikován v různých modifikacích s cílem principiálního ověření schůdnosti přípravy imobilizovaných ve vodě nerozpustných enzymových katalyzátorů, jinými slovy namísto enzymově aktivních buněk různých druhů organismů bylo použito různých do různého stupně čistoty purifikovaných enzymů izolovaných z mikrobiálních, rostlinných a živočišných zdrojů.

Naskytá se otázka účelnosti využití předmětného postupu pro získání imobilizovaných enzymů jestliže tento postup principiálně a s dobrými výtěžky lze využít při použití enzymově aktivních buněk, tedy postupu nevyžadujícího předchozí čištění a izolaci požadovaných enzymů z produkčních buněk různých mikroorganismů.

Důvody pro využití předmětného postupu vyplývají z následujících skutečností.

1. Některé enzymy jsou extracelulární, tedy nejsou zadržovány v produkčních buňkách mikroorganismů, což vylučuje využití imobilizovaných buněk.
2. Řada enzymů, které zůstávají v buňkách a které mají vysokomolekulární substráty /bílkoviny, tuky, polysacharidy/ by byla nevyužita, neboť prostupnost buněčné stěny u mikroorganismů je omezena na sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, což opět vylučuje v těchto případech využití imobilizovaných buněk.
3. Řada průmyslově vyráběných enzymů je jiného než mikrobiálního původu /např. trypsin, chymotrypsin, papain apod./.
4. Je známo, že cena řady imobilizovaných preparátů enzymů je výrazně ovlivněna cenou nosiče; předmětný způsob podle vynálezu nevyžaduje žádných organických, anorganických či přírodních ve vodě nerozpustných nosičů.

Předmětem vynálezu jsou enzymové katalyzátory pro biotransformace sestávající z enzymů mikrobiálního, rostlinného či živočišného původu imobilizovaných chemicky reaktivním polymerem rozpustným ve vodě, vzniklým reakcí ve vodě rozpustné látky, obsahující nejméně dvě primární a/nebo sekundární aminoskupiny, jako je například polyethylenimin, hexamethylendiamin, lysin a polylysin, s bifunkčními aldehydy dikarboxylových kyselin, jako je například glutaraldehyd, popřípadě dále mechanicky zpevněné.

Jako enzymový materiál mohou tyto katalyzátory obsahovat mikrobiální, rostlinné či živočišné enzymy o různé čistotě, a s výhodou technické nebo surové enzymové preparáty nesoucí zejména hydrolázovou, izomerázovou, lyázovou, racemázovou a jinou aktivitu.

Předmětem vynálezu je dále způsob výroby uvedených katalyzátorů, jehož podstata spočívá v tom, že se výše uvedené vodné roztoky enzymů o koncentraci bílkovin 5,0 až 500,0 mg/ml imobilizují uvedením ve styk s ve vodě rozpustným, chemicky reaktivním polymerem, vzniklým reakcí ve vodě rozpustné látky, obsahující nejméně dvě primární a/nebo sekundární aminoskupiny, s výhodou s polyethyleniminem a s bifunkčními aldehydy dikarboxylových kyselin, s výhodou s glutaraldehydem, při teplotě v rozmezí 0 až 60 °C ve vodném prostředí, při pH v rozmezí 4,0 až 12,0, přičemž reakce uvedeného enzymového materiálu s uvedeným polymerem se provádí při teplotě v rozmezí -30 až +50 °C ve vodném prostředí a při

pH v rozmezí 5,0 až 9,0, vzniklé nerozpustné částice se po oddělení z reakční směsi promyjí vodou nebo pufrem, načež se popřípadě mechanicky zpevňují.

Je výhodné, když se k přípravě ve vodě rozpustného polymeru použije vodný roztok polyethyleniminu s distribucí molekulové hmotnosti 100 000 až 800 000.

Výhodně se reakce uvedených enzymů s uvedeným polymerem provádí při teplotě 0 až 45 °C, při relativní odstředivé síle 1 až 50 000 g, při filtračním tlaku od 0 do 50 000 KPa, při stání či míchání nebo při přerušovaném míchání a stání reakční směsi.

Částice imobilizovaných enzymů se popřípadě dále mechanicky zpevňují částečnou dehydratací působením organických rozpouštědel, s výhodou acetonem, popřípadě roztoky lepidel v organických rozpouštědlech nebo jejich směsí s vodou, při teplotách +30 až -25 °C, popřípadě se částice před a/nebo po mechanickém zpevnění vhodným způsobem postformují a parciálně vysuší.

Výhody způsobu podle vynálezu spočívají v tom, že se za pomoci chemicky reaktivních ve vodě rozpustných polymerů /dále jen RRP/ získají imobilizované ve vodě nerozpustné enzymy s dobrou specifickou aktivitou a velmi dobrými sedimentačními vlastnostmi a dobrým výtěžkem imobilizace, který pochopitelně kolísá podle typu enzymu a jeho čistoty od řádově desetin procent až několika desítek procent a to i v případech vysoce citlivých enzymových aktivit ve srovnání s použitím volných velmi reaktivních síťovacích činidel, zejména glutaraldehydu. Mechanismus tvorby RRP je naznačen v popisu vynálezu **k č. 10 231 458** **k** imobilizaci není třeba žádného ve vodě nerozpustného organického, anorganického či přírodního nosiče.

Postup výroby podle předmětného vynálezu principiálně sestává ze dvou technologických operací. V první fázi se připraví chemicky reaktivní ve vodě rozpustný polymer /RRP/, s výhodou reakcí komerčně dostupných flokulantů používaných k čištění odpadních vod obsahujících frakci polyethyleniminu, např. Sedipur KA nebo Sedipur CL-930 s bifunkčním síťovacím činidlem, např. glutaraldehydem, ve vodném prostředí s výhodou za míchání reakční směsi. Rychlost polymerace lze například sledovat na základě změny absorbance přírůstku koncentrací barevných Schiffových bází ve viditelné oblasti spektra /např. při 550 nm/, jejichž koncentrace je především závislá na poměru obou reakčních složek, tj. síťovadla: koreagující sloučenině, reakční době a teplotě. Reakci lze

popsat kinetikou prvního řádu. V druhé fázi se do částečně nebo kvantitativně zreagovaného roztoku RRP /podle citlivosti imobilizovaného enzymu k částečně nezreagovanému glutaraldehydu/, obvykle po 1 až 24 hodinách reakce, vmíchá vodný roztok požadovaného enzymu v rozsahu aktuálních koncentrací bílkovin v reakční směsi 5,0 až 500,0 mg/ml, a v závislosti na použité technice imobilizace, zejména míchání, stání, mrazení, působení filtračního tlaku, odstředivého pole, vytlačování vzniklých částic vhodným zařízením a následného parciálního sušení za sucha či vlhka lze regulovat velikost, tvar, charakter, porozitu a specifickou aktivitu částic imobilizovaných enzymů.

Způsob výroby imobilizovaných enzymů podle vynálezu rovněž zahrnuje postupy následného ošetření imobilizovaných částic vedoucích k zvýšení jejich mechanické stability a pevnosti, zejména částečné dehydratace částic ošetřením acetonem či jinými organickými rozpouštědly, popřípadě a s výhodou roztoky takových komerčních lepidel v organických rozpouštědlech, které po parciálním zaschnutí vytvoří ochrannou mikrovrstvu ve vodě nerozpustného filmu na povrchu částice, za individuální volby podmínek ošetření, za předpokladu z technologického hlediska nepřítli významné limitace enzymové reakční rychlosti difuzí.

Pro výrobu imobilizovaných enzymů podle vynálezu lze principiálně použít různé mikrobiální, rostlinné a živočišné enzymy, zejména extracelulární mikrobiální a rostlinné a živočišné proteázy, například různé čisté preparáty alkalické, neutrální a kyselé proteázy z různých mikrobiálních kmenů například rodu *Bacillus*, proteázy rostlinné například papain a živočišné například trypsin a chymotrypsin a další hydrolázy mikrobiálního původu izolované do různého stupně čistoty z kultivační kapaliny či z buněk mikroorganismů, jako například enzym penicilinamidohydroláza a beta-galaktosidáza z buněk *E.coli*, invertáza z kvasinek, glukózoizomeráza ze *Streptomyces* a podobně. Výhodné je použití tak zvaných technických, nepřítli čistých preparátů enzymů, kdy obsah daného enzymu v preparátu činí 1,0 až 10,0 % z celkového množství bílkovin a kdy se předpokládá využití ve větších objemech výroby pro průmyslové biotransformace. Při přípravě takových imobilizovaných enzymů není na závadu jestliže roztoky technických enzymů obsahují před imobilizací určitý suspenzní podíl buněčného detritu z jednotlivých mikrobiálních buněk či rostlinných nebo živočišných tkání pramenících z procesu izolace, tedy použijí-li se tak zva-

né surové enzymové preparáty.

Velikost částic imobilizovaných enzymů získaných postupem podle vynálezu byla posuzována mikroskopicky /optickým mikroskopem/ s použitím kalibrovaného měrného okuláru. Některé preparáty byly posuzovány rastrovacím elektronovým mikroskopem. K analýze velikosti částic bylo použito kovových sít pro síťovou analýzu a vázané enzymy byly děleny podle velikosti použitím tří sad těchto sít, přičemž síta měla otvory o velikosti od 0,1 až do 2,0 mm. Sedimentační vlastnosti byly hodnoceny tak, že 2,5 vlhké hmoty preparátu bylo suspendováno v celkovém objemu 25 ml de-mineralizované vody v kalibrovaném odměrném válci a byl sledován čas potřebný ke kvantitativní sedimentaci částic.

Aktivity imobilizovaných enzymů byly hodnoceny za míchání a teploty definovaného množství částic v roztoku substrátu za podmínek měření v oblasti kinetiky nultého řádu enzymové reakce a enzymová aktivita resp. specifická aktivita vyjadřována jako množství vytvořených umolů produktu resp. produktů/mg nebo gram vlhké hmoty částic, nebo jako procento konverse přeměněného substrátu na produkt, pokud není v příkladech uvedeno jinak. Po dekantaci a vakuové filtraci částic imobilizovaných enzymů činila jejich průměrná vlhkost /obsah vody/ 90 %.

V následujících příkladech provedení se jako látky obsahující alespoň dvě primární a/nebo sekundární aminoskupiny používá komerčních flokulantů typu Sedipur a to Sedipur KA nebo Sedipur CL-930, který obsahuje polyethylenimin o molekulové hmotnosti 200 000 až 300 000 v koncentraci přibližně 30 hmotnostních procent, nebo polylysin hydrochlorid o molekulové hmotnosti přibližně 40 000 až 50 000.

V dalším je vynález blíže objasněn v příkladech provedení, aniž by se jimi omezoval.

Příklady provedení

Příklad 1

231 858

Bylo připraveno 50 ml 2 % /hmota/objem/ vodného roztoku Sedipuru CL-930 /BASF, A.G./ v demineralizované vodě. Do tohoto roztoku, jehož pH bylo 6,1 byl přidán 25 % vodný roztok glutaraldehydu /MERCK/ tak, aby jeho koncentrace v reakční směsi činila 1,0 % /objem/objem/. Reakční směs byla umístěna na laboratorní třepací stroj a ve zvolených časových intervalech byla sledována rychlost polymerace spektrofotometricky při 550 nm /Unicam, SP-500, hranaté skleněné kyvety 10 x 10 mm/. Reakce probíhala za nepřetržitého míchání při teplotě místnosti. Hodnoty absorbancí z jednotlivých vzorků odebíraných v závislosti na čase z reakční směsi byly měřeny proti demineralizované vodě. Reakce probíhala 24 h.

0,75 g lyofilizovaného technického preparátu beta-galaktosidázy izolované z buněk *Escherichia coli* o specifické aktivitě 30, μmol o-nitrofenolu/min/mg bílkovin /37 °C, pH 7,0, substrát o-nitrofenyl beta-D-galaktopyranosid/ bylo rozpuštěno v 0,05 M fosfátovém pufru pH 7,0 na celkový objem roztoku 25 ml; vznikl roztok technického enzymu o celkové koncentraci bílkovin 30 mg/ml.

K 25 ml popsaným způsobem připraveného roztoku technické beta-galaktosidázy bylo přidáno 25 ml popsaným způsobem připraveného RRP, reakční směs krátce promíchána a vzniklý precipitát obsahující 15 mg bílkovin/ml byl přelit na misku zhotovenou z hliníkové fólie o $\varnothing$ 20 cm a miska s reakční směsí uložena do mrazicího boxu při teplotě -20 °C po dobu 3 hodin. Po této době byla miska z boxu vyjmuta, zmrzlý obsah na misce přelit přibližně 50 ml téhož pufru v jakém byl rozpuštěn enzym a obsah ponechán zvolna rozmrazit při teplotě místnosti po dobu 30 min. Po této době byly vytvořené voluminózní částice přelity do 200 ml téhož pufru a několikrát tímto pufrem dekantovány vždy po kvantitativní sedimentaci částic stáním. Poté byly částice vakuově dobře odsáty na fritě přes filtrační papír a odsáté zváženy /0,92 g/.

0,92 g vlhké hmoty částic imobilizovaného enzymu, po předchozí mechanické homogenizaci voluminózní hmoty, bylo suspendováno ve 20 ml acetonu předem vychlazeného na -20 °C a po dobu 2 minut intenzivně pomocí vrtulového míchadla mícháno. Po této době byly částice ostře vakuově odsáty a na fritě několikrát

promyty tímtež pufrem a dobře odsátý a promytý materiál zvážen /0,45 g/.

Specifická aktivita materiálu činila 8,6 μ mol o-nitrofenolu/min/mg vlhké hmoty imobilizovaného enzymu. Materiál byl tvořen voluminózními vločkami béžové barvy o velikosti 0,5 až 2 mm, které sedimentovaly kvantitativně stáním během jedné minuty. Mikroskopický obraz a snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu prokázal určitou porozitu částic, které připomínaly svým charakterem polyuretanovou pěnu; částice tvořily amorfni útvary s nepravidelnými okraji.

Příklad 2

Bylo připraveno 50 ml 2 % /hmota/objem/ vodného roztoku Sedipuru CL-930 v demineralizované vodě. Roztok flokulantu byl vakuově přefiltrován přes porcelánovou fritu S-4 tak, aby byla dokonale odstraněna nerozpustná frakce hydrofilních krupiček. K 50 ml dokonale rozpustného čirého filtrátu byl přidán 25 % vodný roztok glutaraldehydu tak, aby jeho koncentrace v reakční směsi činila 1,0 % /objem/objem/ a dále bylo postupováno jak je uvedeno v příkladu 1 s tím rozdílem, že reakce probíhala 3 hodiny za jinak stejných reakčních podmínek a podmínek sledování rychlosti polymerace.

2,5 g lyofilizovaného technického preparátu beta-galaktosidázy jako v příkladu 1 bylo rozpuštěno ve 25 ml fosfátového pufru rovněž jak je uvedeno v příkladu 1. Vznikl roztok technického enzymu o celkové koncentraci bílkovin 100 mg/ml.

K 25 ml roztoku technické beta-galaktosidázy bylo přidáno 25 ml popsáním způsobem připraveného RRP a roztoky promíchány. Reakční směs obsahující 50 mg/ml bílkovin byla umístěna na rotační třepací stroj o počtu otáček 160/min a jednu hodinu nepřetržitě míchána a poté ponechána stát 1 hodinu v klidu při teplotě místnosti. Vzniklé nerozpustné částice byly vakuově přes textilní materiál odsáty a na fritě důkladně promyty dvěma litry 0,05 M fosfátového pufru pH 7,0, znovu důkladně vakuově odsáty a zváženy; bylo získáno 3,75 g vlhké hmoty imobilizovaného enzymu.

Vlhké částice imobilizované beta-galaktosidázy byly suspendovány v acetonu za podmínek a způsobem uvedeným v příkladu 1 a dobře odsátý a stejným způsobem promytý materiál zvážen /1,12 g/.

Specifická aktivita materiálu činila 15.1 μ mol o-nitrofenolu/min/mg vlhké hmoty imobilizovaných částic. Materiál byl tvořen nepravidelnými destičkami béžové barvy s distribucí velikosti částic 0,3 až 2,8 mm, které sedimentovaly kvantitativně stáním během několika desítek sekund.

Jeden g vlhké hmoty částic imobilizované beta-galaktosidázy byl suspendován ve 25 ml 5 % /w/v/ roztoku laktózy rozpuštěné v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,0, nádobka umístěna do termostatu při teplotě 37 °C a v čase sledována rychlost enzymové hydrolýzy laktózy na glukózu a galaktózu v průběhu nepřetržitého míchání. Ke kvantitativní konverzi /100 %/ laktózy na oba zmíněné monosacharidy došlo za uvedených reakčních podmínek za 3 hodiny. Enzymová hydrolýza s toutéž nasadou katalyzátoru byla opakována celkem pětkrát vždy tak, že po skončení reakce byla reakční směs přes husté polyamidové sítko slita, zachycené částice promyty 100 ml zmíněného pufru a znovu suspendovány v čerstvé nasadě roztoku laktózy za jinak stejných reakčních podmínek při stejné reakční době. Průměrný stupeň konverze/pět opakovaných cyklů použití téže nasady imobilizované galaktosidázy činil 98,2 %.

Příklad 3

Bylo připraveno 50 ml RRP postupem uvedeným v příkladu 1 s tím rozdílem, že reakční doba polymerace činila jednu hodinu. Dále bylo připraveno 50 ml roztoku technické penicilinacylázy tak, že 6 g lyofilizovaného enzymu bylo rozpuštěno v 0,05 M fosfátovém pufru pH 7,6 a doplněno na uvedený objem. Vznikl roztok technického enzymu obsahující 120 mg bílkovin/ml o specifické aktivitě penicilinacylázy 260 μ mol 6-aminopenicilánové kyseliny/h/mg bílkovin /pH 7,6, teplota 42 °C, substrát K-sůl-benzylpenicilinu/. Enzym byl izolován z buněk vysokoprodukční mutanty E.coli.

Roztok enzymu byl kvantitativně přelit do 200 ml skleněné nádoby, do níž bylo zavedeno vertikální ocelové vrtulové míchadlo a spuštěno míchání o počtu otáček 120/min. Poté byl smíchán roztok RRP s roztokem enzymu v objemovém poměru 1 : 1 na celkový objem 100 ml; aktuální koncentrace bílkovin v reakční směsi činila 60 mg/ml. Reakční směs byla nepřetržitě míchána po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti, poté míchadlo vypnuto a vytvořená suspenze ponechána v klidu 30 minut stát, načež byla přelita po

mírném promíchání na ocelové síto o velikosti ok 0,1 mm a na sítu částice promyty plavením demineralizovanou vodou. Voluminózní částice byly suspendovány ve 100 ml 0,05 M fosfátového pufru pH 7,6 a vakuově dobře odsáty a za míchání suspendovány v 50 ml acetonu předem vychlazeného na teplotu -20°C . Materiál byl intenzivně míchán po dobu tří minut a poté ostře vakuově odsát, na fritě ještě přibližně 5 min odsáván a poté promyt jedním litrem zmíněného pufru, znovu odsát a zvážen /4,3 g/.

Specifická aktivita materiálu činila 12,6 $\mu\text{mol 6-APK/h/mg}$ vlhké hmoty imobilizovaných částic. Materiál tvořil světlehnědé částice přibližně sférického tvaru s průměrnou distribucí velikosti 0,45 - 2,0 mm a k jeho kvantitativní sedimentaci vedlo stání po dobu několika desítek sekund.

2 g vlhké hmoty imobilizované penicilinacylázy bylo suspendováno v 50 ml 6 % /w/v/ roztoku K-soli benzylpenicilinu rozpuštěného v demineralizované vodě a v průběhu nepřetržitého míchání a teploty při 37°C za kontinuální úpravy pH na hodnotu 7,8 zředěnou čpavkovou vodou /15 % v/v/ byla sledována reakční rychlost konverze benzylpenicilinu na 6-APK. Ke kvantitativní konverzi substrátu na zmíněný produkt došlo za uvedených reakčních podmínek za 90 minut. Enzymová hydrolýza s toutéž násadou katalyzátoru byla opakována celkem desetkrát vždy tak, že po skončení reakce byla reakční směs přes husté polyamidové sítko slita, zachycené částice promyty 100 ml vody a znovu suspendovány v čerstvé násadě roztoku benzylpenicilinu za jinak stejných reakčních podmínek při stejné reakční době a postupu enzymové biotransformace. Průměrný stupeň konverze/10 opakovaných cyklů použití téže národy imobilizované penicilinacylázy činil 97,3 %, koncentrace zbytkového penicilinu byla nulová a průměrné množství degračních produktů penicilinu a 6-APK činilo 2,5 %.

Příklad 4

Bylo připraveno 50 ml RRP postupem uvedeným v příkladu 1 s tím rozdílem, že na místo Sedipuru CL-930 byl použit Sedipur KA. Dále bylo připraveno 50 ml roztoku technické penicilinacylázy o specifické aktivitě a způsobem uvedeným v příkladu 3 s tím rozdílem, že roztok enzymu v pufru obsahoval 60 mg/ml bílkovin.

50 ml roztoku RRP bylo smícháno s 50 ml roztoku enzymu; vznikla reakční směs o aktuální koncentraci bílkovin 30 mg/ml.

Dále bylo při imobilizaci enzymu postupováno jako v příkladu 1 /mražení reakční směsi po dobu tří hodin/. Poté byly vytvořené částice přelity pufrem a několikrát dekantovány přibližně 100 ml 0,05 M fosfátového pufru pH 7,6 vždy po kvantitativní sedimentaci částic stáním, dále vakuově dobře přes textilní materiál odsáty a odsáté zváženy /2,3 g/.

Uvedené množství imobilizované penicilinacylázy bylo ošetřeno předchlazeným acetonem způsobem uvedeným v příkladu 1 a dobře odsáté a fosfátovým pufrem promyté částice zváženy /1,46 g/ a ostrým kopím homogenizovány na menší kousky. Imobilizovaný a ošetřený materiál byl pak ponechán botnat v 50 ml uvedeného pufru přes noc při teplotě +8 °C.

Specifická aktivita materiálu činila 4,5 μ mol 6-APK/h/mg vlhké hmoty imobilizovaných částic. Materiál po nabotnění tvořil béžové ohraničené pevné destičky nepravidelného tvaru s průměrnou distribucí velikostí 0,8 až 4,0 mm a sedimentoval kvantitativně stáním během několika sekund.

Jeden gram vlhké hmoty imobilizované penicilinacylázy bylo suspendováno v 50 ml 6 % /w/v/ roztoku K-soli desacetoxycefalosporinu - G rozpuštěného v demineralizované vodě a v průběhu nepřetržitého míchání a temperace při 37 °C za kontinuální úprav pH na hodnotu 7,6 zředěným roztokem NaOH /0,1 M/ byla sledována reakční rychlost konverze desacetoxycefalosporinu G na kyselinu 7-desacetoxycefalosporánovou /7-ADCK/. Ke kvantitativní konverzi substrátu na zmíněný produkt došlo za uvedených podmínek za 150 minut. Enzymová hydrolýza s toutéž násadou katalyzátoru byla opakována celkem třikrát způsobem popsáním v příkladu 3. Průměrný stupeň konverze/3 cykly opakovaného použití téže národy imobilizované penicilinacylázy činil 93,6 %, koncentrace zbytkového desacetoxycefalosporinu činila 1 %, průměrné množství degradačních produktů desacetoxycefalosporinu a 7-ADCK činilo 4,3 %.

Příklad 5

Bylo připraveno 100 ml roztoku RRP postupem uvedeným v příkladu 1. Dále byl připraven roztok proteázy živočišného původu takto. 3,0 g suché hmoty lyofilizovaného chymotrypsinu /n.p. Léčiva - SPOFA/ o specifické aktivitě 3,0 j/mg /substrát kasein, teplota 35 °C, pH 8,0/, bylo rozpuštěno ve 40 ml 0,05 M fosfátového pufru o pH 7,6 a za nepřetržitého míchání bylo pH roztoku enzymu

upraveno 10 % roztokem NaOH na hodnotu 7,2 a doplněno zmíněným pufrem na celkový objem 50 ml. Vznikl roztok proteázy o pH 7,2 a koncentraci bílkovin 60 mg/ml. Roztok byl rozdělen na dvě stejné objemové části /á 25 ml/ a dále postupováno takto.

K 25 ml tohoto roztoku bylo přidáno 25 ml RRP, krátce a rychle promícháno a precipitát přelit na misku zhotovenou z hliníkové fólie a dán zmrazit při teplotě -20°C do mrazicího boxu po dobu tří hodin; aktuální koncentrace bílkovin v reakční směsi činila 30 mg/ml. Po této době byla miska vyjmuta, obsah přelit stejným fosfátovým pufrem a ponechán rozmrazit při teplotě místnosti, poté materiál několikrát dekantován tímtéž pufrem za mírného míchání tyčinkou, poté kapalina slita a částice zfiltrvány přes kalolisovou plachetku za vakua. Vlhký, dobře odsátý materiál po filtraci ostrým kopím homogenizován na přibližně stejně velké částice a rozdělen na dva stejné hmotnostní podíly.

Jedna část materiálu přelita 50 ml téhož fosfátového pufru a ponechána botnat při $+8^{\circ}\text{C}$ do druhého dne /vzorek označen a_1 /. Druhá část byla ošetřena 25 ml acetonu vychlazeného předem na -20°C za míchání po dobu 2 minut, poté materiál ihned ostře vakuově odsát a odsátý několikrát dekantován tímtéž fosfátovým pufrem, znovu odsát, homogenizován ostrým kopím, přelit cca 50 ml téhož pufru a ponechán botnat při $+8^{\circ}\text{C}$ do druhého dne /vzorek označen a_2 /.

K 25 ml roztoku téhož enzymu /druhá objemová část/ bylo přidáno 25 ml téhož roztoku RRP, čímž vznikl roztok o aktuální koncentraci bílkovin v reakční směsi 30 mg/ml a 30 minut byla reakční směs míchána na laboratorní třepačce při teplotě místnosti a poté precipitát ponechán při této teplotě stát po dobu dvou hodin. Po této době byla reakční směs odstředěna 5 minut při 5000 g, čirý supernatant slit a sediment rozmíchán ve 100 ml téhož pufru, několikrát tímtéž pufrem dekantován, po dekantaci částice přes textilní materiál vakuově odsáty, promyty pufrem a dobře odsáté popsáním způsobem homogenizovány.

Dále byl imobilizovaný materiál ošetřen acetonem, promyt, homogenizován a ponechán botnat způsobem popsáním u vzorku a_2 v tomto příkladu. Vzorek byl označen b_1 .

Enzymové aktivity vázaného chymotrypsinu uvedenými způsoby imobilizace jsou shrnuty v následující tabulce.

Označení vzorku	a_1	a_2	b_1
získáno vlhké hmoty materiálu /g/	2,3	1,6	1,5
specifická aktivita /j/mg vlhké hmoty/	$7,3 \cdot 10^{-3}$	$4,4 \cdot 10^{-3}$	0,015
výtěžek imobilizace ^{+/} /%/	0,75	0,3	1,0

^{+/} vztaženo na výchozí rozpustný chymotrypsin.

Všechny získané imobilizované vzorky chymotrypsinu sedimentovaly kvantitativně během několika desítek sekund, částice proteázy imobilizované mražením vykazovaly na snímcích z rastrovacího elektronového mikroskopu nižší porozitu částic ve srovnání se snímky vzorků získaných technikou míchání/stání s odstředěním, což je v souladu se zjištěnou specifickou aktivitou imobilizovaných materiálů.

Příklad 6

Bylo připraveno 50 ml RRP postupem uvedeným v příkladu 1 s tím rozdílem, že reakční doba polymerace činila 16 hodin. Dále byl připraven roztok proteázy rostlinného původu takto. 6,0 g suché hmoty papainu /Fluka, A.G., Švýcarsko/ o specifické aktivitě 1,0 j/mg bylo rozpuštěno v 50 ml 0,05 M fosfátovém pufru o pH 7,6. Vznikl roztok papainu o koncentraci bílkovin 120 mg/ml.

K 50 ml roztoku tohoto enzymu bylo přidáno 50 ml RRP a reakční směs nepřetržitě míchána pomocí vertikálně umístěného ocelového míchadla s intenzitou 60 ot/min při teplotě místnosti po dobu 30 min a poté ponechána 30 minut v klidu. Vzniklá suspenze byla vakuově pře kalolisovou plachetku filtrována, promyta jedním litrem téhož pufru a znovu vakuově odsáta a nerozpustný materiál zvážen /10,2 g/. Imobilizovaný materiál byl po homogenizaci rozdělen na dvě stejné hmotnostní části /přibližně á 5 g/, přičemž první část byla suspendována v 50 ml předchlazeného acetonu způsobem, který je uveden v příkladu 5 včetně promytí a botnění, druhá část byla vpravena do injekční stříkačky a vytlačena do formy válcovitých útvarů stříkačkou bez jehly na hliníkovou fólii. Po vytlačení

ní byl materiál sušen tři hodiny na vzduchu při teplotě místnosti. Po částečném vysušení byl materiál homogenizován nožem na přibližně stejné válečky, tyto přelity 50 ml téhož pufru a ponechány botnat přes noc při +8 °C.

Bylo získáno 3,2 g imobilizovaného papainu o specifické aktivitě 0,017 j/mg vlhké hmoty v případě prvého /materiál ošetřený acetonem/ a 3,6 g téhož imobilizovaného enzymu o specifické aktivitě 0,0095 j/mg vlhké hmoty v případě druhém /postformovaný, parciálně sušený materiál/. Oba materiály sedimentovaly kvantitativně během několika desítek sekund, průměrná distribuce velikosti částic prvního /ošetřeného/ materiálu činila 0,45 μ 1,75 mm, u druhého vzorku /postformovaný materiál/ tvořily částice válcovité útvary přibližně 1,0 μ 1,5 mm silné a 1,5 μ 4,0 mm dlouhé.

Příklad 7

Bylo připraveno 25 ml 0,1 % /hmota/objem/ vodného roztoku polylyzinu.HCL o molekulové hmotnosti 40 000 až 50 000 v destilované vodě. Do tohoto roztoku byl přidán 25 % vodný roztok glutaraldehydu tak, aby jeho koncentrace v reakční směsi činila 0,15 procent /objem/objem/. Reakční směs byla umístěna na laboratorní třepačku a ve zvolených časových intervalech byla sledována rychlost polymerace spektrofotometricky při 415 nm. Reakce probíhala za nepřetržitého míchání při teplotě místnosti po dobu 4 hodin.

25 ml surového preparátu invertázy získané rozbitím buněk a částečným odstředěním buněčné detritu odpadních pivovarských kvasinek *Saccharomyces carlsbergensis* o koncentrací bílkovin 11,6 mg/ml a specifické aktivitě 2,8 j/mg /substrát sacharóza, pH 4,9, teplota 30 °C/ bylo smícháno s 25 ml RRP, jehož způsob přípravy byl uveden v předchozím odstavci. Reakční směs byla intenzivně promíchána a přelita na misku zhotovenou z hliníkové fólie a uložena na dobu 4 hodin do mrazicího boxu při teplotě -25 °C. Po této době byla miska z mrazicího prostoru vyjmuta a její obsah přelit 0,05 M acetátovým pufrům o pH 4,9 a ponechán samovolně rozmrazit při teplotě místnosti. Vzniklý houbovitý precipitát byl vakuově zfiltrován a vpraven do injekční stříkačky a vytlačen do formy válcovitých útvarů stříkačnou bez jehly na hliníkovou fólii. Po vytlačení byl materiál sušen 5 hodin na

vzduchu při teplotě místnosti. Po částečném vysušení byl materiál homogenizován nožem na přibližně stejné válečky, tyto přelity 50 ml téhož acetátového pufru a ponechány botnat přes noc při +8 °C.

Bylo získáno 1,04 g postformovaných částic imobilizované invertázy ve tvaru válečků. Uvedené množství imobilizovaného enzymu bylo suspendováno v 50 ml 10 % roztoku sacharózy rozpuštěné ve zmíněném acetátovém pufru pH 4,9 a v průběhu nepřetržitého míchání při teplotě 30 °C byla provedena enzymová inverze sacharózy na směs glukózy a fruktózy. Enzymová biotransformace byla kvantitativní za uvedených podmínek reakce za 6 hodin. Tento postup byl opakován třikrát s touže násadou katalyzátoru, přičemž po každém ze skončených cyklů enzymové inverze byl katalyzátor oddělen přes polyamidové sítko, promyt zmíněným pufrem a znovu použit. Průměrný stupeň enzymové inverze/3 cykly opakování použití téže národy katalyzátoru činil 86,2 %.

Příklad 8

5 litrů zahuštěné vodné suspenze buněk *Streptomyces phaeochromogenes* /40 objemových % biomasy/ obsahujících enzym glukózoizomerázu bylo ochlazeno na +5 °C. Poté byla suspenze desintegrována dvojnásobným průchodem šterbinovým mechanickým desintegrátorem při tlaku 250 atm. Suspenze mezi jednotlivými desintegracemi byla průběžně chlazena tak, aby maximální teplota desintegrované směsi nepřesáhla 45 °C. Poté byla suspenze odstředěna /Janetzki S-70, 5 000 g, 30 minut/ a zakalený, silně opalescentní supernatant slit. Bylo získáno 2,8 litru surového enzymového preparátu o koncentraci 105,6 mg/ml bílkovin a specifické aktivitě glukózoizomerázy 0,8 μ mol fruktózy/min/mg bílkovin /teplota 60 °C, pH 9,3, substrát glukóza/.

Ke 100 ml popsaným způsobem získané surové glukózoizomeráze bylo přidáno 100 ml RRP, jehož způsob přípravy byl uveden v příkladu 1 s tím rozdílem, že reakční doba polymerace činila jednu hodinu a s tím rozdílem, že koncentrace flokulantu činila 4 % a koncentrace glutaraldehydu 2 %. Aktuální koncentrace bílkovin v reakční směsi činila 52,8 mg/ml. Reakční směs byla jednu hodinu nepřetržitě míchána pomocí vrtulového ocelového míchadla o počtu otáček 60/min při teplotě místnosti. Po této době byl vzniklý houbovitý precipitát odstředěn /5 000 g/15 min/, super-

natant slit a vzniklá hmota vpravena ve formě vlhkého koláče do sáčku z kalolisové tkaniny, otvor sáčku přehnut a zajištěn kovovými svorkami, sáček vložen mezi dvě kovové desky ve vodorovné poloze a vystaven krátkodobě hydraulickému tlaku $1,25 \cdot 10^4$ kPa pomocí hydraulického lisu při teplotě místnosti po dobu 10 minut. Po této době byla hmota ve formě desky mechanicky rozrušena rozlámáním na menší kousky a vpravena do masového strojku se speciální ocelovou vložkou o velikosti pórů 1 mm a přes tuto vložku vytlačena do formy amorfních granulí. Materiál byl suspendován ve 100 ml 2 % roztoku lepidla /Kanagomu/ v acetonu předem vychlazeného na teplotu -20°C a po dobu 2 minut promícháván, poté ostře vakuově odsát přes kalolisovou plachetku a na nuči ještě odsáván po dobu 15 minut. Poté byl materiál přenesen do 100 ml Britton-Robinsonova pufru o pH 8,0 a ponechán botnat při $+8^\circ\text{C}$ přes noc v lednici.

Celkem bylo získáno 8,4 g vlhké hmoty granulovaného pevného materiálu imobilizované glukózoizomerázy o specifické aktivitě 0,12 μmol fruktózy/min/mg vlhké hmoty. Materiál sedimentoval kvantitativně během několika sekund. 5 g tohoto materiálu bylo suspendováno v 50 ml 1 M roztoku D-glukózy o pH 9,0. Roztok glukózy byl předem vytemperován na 60°C . Reakční směs byla nepřetržitě míchána. Po 4 hodinách reakce za uvedených podmínek došlo k izomeraci glukózy na směs fruktózy + glukózy v poměru koncentrací uvedených monosacharidů v uvedeném pořadí 40 : 60 %. Postup byl opakován se stejnou násadou katalyzátoru ještě pětkrát za stejných reakčních podmínek se stejným výsledkem. Katalyzátor byl po opakovaném použití oddělen z reakční směsi a promyt vodou již popsaným způsobem.

Příklad 9

2,5 kg buněčné pasty *Alcaligenes metalcaligenes* obsahující enzym aspartát amoniak lyázu bylo suspendováno v demineralizované vodě na celkový objem 10 litrů. Buněčná suspenze byla ochlazená na $+5^\circ\text{C}$ a poté dezintegrována při tlaku 250 atm trojnásobným průchodem šterbinovým mechanickým dezintegrátorem. Suspenze mezi jednotlivými desintegracemi byla průběžně chlazená tak, aby maximální teplota dezintegrované směsi nepřesáhla 35°C . Poté byla dezintegrovaná suspenze po částech odstředěna způsobem popsaným v příkladu 8. Bylo získáno 5,8 litrů surového roztoku enzymu o kon-

centraci 110 mg/ml bílkovin o specifické aktivitě 165 / μ mol kys. L-asparagové/min/mg bílkovin /substrát fumaran amonný, teplota 37 °C, pH 8,5/.

Ke 100 ml RRP, jehož způsob přípravy byl uveden v příkladu 1, bylo přidáno 100 ml surového preparátu aspartát amoniak lyázy získané způsobem popsaným v předchozím odstavci. Koncentrace bílkovin v reakční směsi činila 55 mg/ml. reakční směs byla jednu hodinu nepřetržitě míchána, poté odstředěna za podmínek a způsobem manipulace uvedeným v příkladu 8. Dále bylo při zpracování materiálu /působení filtračního tlaku, mletí/ postupováno rovněž způsobem uvedeným v příkladu 8 s tím rozdílem že postformovaný nepromytý granulovaný materiál nebyl ošetřen ani acetonem ani roztokem lepidla v acetonu, nýbrž sušen 5 hodin volně na vzduchu. Po této době byl materiál přenesen do 1,35 M roztoku fumaranu amonného o pH 8,5 a ponechán botnat přes noc při +8 °C.

Celkem bylo získáno 7,5 g granulovaného pevného materiálu imobilizované aspartát amoniak lyázy o specifické aktivitě 750 / μ mol kys. L-asparagové/min/g vlhké hmoty; imobilizovaný materiál sedimentoval kvantitativně během několika desítek sekund. 5 g tohoto materiálu bylo suspendováno v 50 ml 1,35 M roztoku fumaranu amonného o pH 8,5. Roztok substrátu byl předem vytemperován na 37 °C. Reakční směs byla nepřetržitě míchána. Po 2,5 h reakce za uvedených podmínek došlo ke kvantitativní konverzi zmíněného substrátu na produkt, kyselinu L-asparagovou. Postup byl opakován se stejnou násadou katalyzátoru celkem pětkrát za stejných reakčních podmínek. Katalyzátor byl po opakovaném použití oddělen z reakční směsi pomocí polyamidového sítky, na sítku promyt vodou a znovu použit. Průměrný stupeň konverze/5 cyklů opakovaného použití činil 99,6 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

231 658

(vyznačené tím, že

1. Enzymové katalyzátory pro biotransformace, sestávající z enzymů mikrobiálního, rostlinného či živočišného původu, imobilizovaných chemicky reaktivním polymerem rozpustným ve vodě, vzniklým reakcí ve vodě rozpustné látky, obsahující nejméně dvě primární a/nebo sekundární aminoskupiny, jako je například polyethylenimin, hexamethyldiamin, lysin, a polylysin, s bifunkčními aldehydy dikarboxylových kyselin, jako je například glutaraldehyd, popřípadě dále mechanicky zpevněných.
2. Enzymové katalyzátory podle bodu 1, vyznačené tím, že uvedený enzymový materiál obsahuje enzymy o různé čistotě, s výhodou technické nebo surové enzymové preparáty, nesoucí výhodně hydrolázovou, izomerázovou, lyázovou nebo racemázovou aktivitu.
3. Enzymové katalyzátory podle bodů 1 a 2, vyznačené tím, že uvedený enzymový materiál je imobilizován chemicky reaktivním polymerem rozpustným ve vodě, vzniklým reakcí polyethyleniminu s distribucí jeho molekulové hmotnosti 100 000 až 800 000 s glutaraldehydem.
4. Způsob výroby enzymových katalyzátorů pro biotransformace podle bodu 1, vyznačený tím, že se vodné roztoky mikrobiálních, rostlinných či živočišných enzymů o koncentraci bílkovin 5,0 až 500,0 mg/ml imobilizují uvedením ve styk s ve vodě rozpustným, chemicky reaktivním polymerem, vzniklým reakcí ve vodě rozpustné látky obsahující nejméně dvě primární a/nebo sekundární aminoskupiny, s výhodou polyethyleniminem, s bifunkčními aldehydy dikarboxylových kyselin, s výhodou s glutaraldehydem, při teplotě v rozmezí 0 až 60 °C ve vodném prostředí, při pH v rozmezí 4,0 až 12,0, přičemž reakce uvedeného enzymového materiálu s uvedeným polymerem se provádí při teplotě v rozmezí -30 až +50 °C ve vodném prostředí a při pH v rozmezí 5,0 až 9,0, vzniklé nerozpustné částice se po oddělení z reakční směsi promyjí vodou nebo pufrem, načež se popřípadě mechanicky zpevňují.

5. Způsob podle bodu 4, vyznačený tím, že se ve vodě rozpustný polymer připraví z vodného roztoku polyethyleniminu s distribucí molekulové hmotnosti 100 000 až 800 000 a/nebo z vodného roztoku polylyzinu s distribucí molekulové hmotnosti 5 000 až 50 000.
6. Způsob podle bodů 4 a 5, vyznačující se tím, že se reakce uvedených enzymových materiálů s uvedenými reaktivními polymery provádí při teplotě 0 až 45 °C, při relativní odstředivé síle 1 až 50 000 g, při filtračním tlaku od 0 do 50 000 KPa, při stání či míchání nebo při přerušovaném míchání a stání reakční směsi.
7. Způsob podle bodů 4 a 5, vyznačující se tím, že částice imobilizovaných ve vodě nerozpustných enzymů se popřípadě dále mechanicky zpevňují částečnou dehydratací působením organických rozpouštědel, s výhodou acetonem, popřípadě roztoky lepidel v organických rozpouštědlech nebo jejich směsí s vodou, při teplotách +30 až -25 °C, popřípadě se vzniklé částice před a/nebo po mechanickém zpevnění vhodným způsobem posformují a parciálně vysuší.