



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

197 101

(11) [B1]

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 11 08 77
(21) PV 5321-77

(51) Int. Cl. C 12 P 37/00

(40) Zveřejněno 31 01 79
(45) Vydáno 30 04 82

(75)

Autor vynálezu VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr.CSc., ZEMAN ROMAN RNDr., BÁRTA MIROSLAV RNDr.,
ČULÍK KAREL RNDr., CHALOUPKA JIŘÍ RNDr.DrSc., KÁLAL JAROSLAV prof.ing.DrSc.,
DROBNÍK JAROSLAV doc.RNDr.CSc., PRAHA a ŠVEC FRANTIŠEK ing.,CSc., Kladno

(54) Mikrobiální buněčné agregáty k přeměně penicilínu na kyselinu
6-aminopeniciliánovou a způsob jejich přípravy

1

Vynález se týká mikrobiálních buněčných agregátů, obsahujících buňky s vysokým obsahem enzymu penicilinacylázy, které jsou vázány navzájem nebo na buněčné nosiče různých druhů organismů, kterými jsou buď celé, neporušené anebo fyzikálně, chemicky či biochemicky ošetřené buňky nebo jejich nerozpustné fragmenty, chemicky, kovalentní vazbou a způsobu jejich přípravy. Mikrobiální buněčné agregáty jsou použitelné k přípravě 6-aminopeniciliánové kyseliny enzymovou hydrolýzou penicilínu, zejména benzylpenicilínu, přičemž jejich vlastnosti, zejména chemicky vysoce stabilizovaná enzymová aktivita, dobré sedimentační a mechanické vlastnosti, dovoluují jejich dlouhodobé použití na principu enzymového reaktoru, vsádkovým nebo kontinuálním způsobem, podle volby technologie enzymové hydrolýzy, resp. volby typu reaktoru, s následnou izolací 6-aminopeniciliánové kyseliny úpravou pH a teploty z čiré kapaliny, resultující po jejich snadném oddělení.

Běžně známé způsoby přípravy 6-aminopeniciliánové kyseliny (6-APK), která je důležitým meziproduktem pro přípravu tzv. polosyntetických penicilínů, jsou v podstatě čtyř základních typů, přičemž každý z nich má své výhody a nevýhody a tím ekonomické limity.

Jednorázové použití nativních buněk mikroorganismů, obsahujících aktivní enzym penicilinacylázu k enzymové přeměně benzylpenicilínu nebo fenoxymethylpenicilínu na 6-APK; např. NSR patentový spis č. 1 114 766 uvádí jednorázové použití nativních buněk E.coli ke štěpení benzylpenicilínu.

Podstatnou nevýhodou využití tohoto postupu v praxi je požadavek stále a opakované přípravy těchto buněk novou kultivací ve velkokapacitním fermentačním zařízení, neboť buňky se nedají

použít opakovaně, nehledě na skutečnost kontaminace produktu bílkovinami z autolysovaných buněk a zbytky kultivační kapaliny a z toho vyplývající složitosti volby vhodného izolačního postupu.

Chemický způsob přípravy 6-APK z penicilínu; tento způsob, diskutovaný např. v přehledném článku T.R. Carringtona (Proc. R. Soc. Lond. B. 179, 321-333, 1971) je ekonomicky velice náročný, zejména pro nutnost chemického chránění skupin penicilínu, dále pro nutnost použití velmi nízkých teplot reakční směsi při chemické hydrolýze (kolem -50°C), v neposlední řadě pro použití velkého množství organických rozpouštědel s omezenou možností jejich regenerace a konečně pro použití agresivních látek, které přispívají ke značnému a rychlému opotřebení výrobní aparatury vlivem koroze. Výhodou tohoto postupu však je možnost přípravy kvalitní 6-APK, neobsahující balastní bílkovinné příměsi a možnost hydrolýzy vysokých koncentrací penicilínu s dobrým výtěžkem v izolačním stupni.

Způsob přípravy 6-APK fyzikálně nebo chemicky imobilizovanou penicilinacylázou na nejružnější anorganické, umělé organické nebo přírodní materiály. Pro vazbu na tyto nosiče je používáno do různého stupně čištěných preparátů penicilinacylázy, získaných z buněk mikroorganismů relativně drahými, složitými a hlavně ztrátovými postupy. Tak např. čs. patentový spis č. 145 849 uvádí postup čištění penicilinacylázy a její vazby na nosič. Tato mnohostupňová příprava končí získkem cca 30 % původního množství enzymu o čistotě technického preparátu penicilinacylázy 10 až 20 %, vztaženo na čistý enzym. Tento technický preparát enzymu pak slouží k vazbě na některé nosiče např. polysacharidového typu (komerčně dostupné pod názvem Sepharose) po jejich předchozí chemické aktivaci bromkyanem.

Nosiče tohoto a podobných typů jsou velice drahé, které náklady na vázaný enzym zvyšují do té míry, že jen cca 200 násobné použití vázaného enzymu ve srovnání s jednorázovým použitím nativních buněk přináší lepší efektivnost. Limitujícími ekonomickými faktory při tomto způsobu výroby jsou tedy cena a dostupnost nosiče, cena zahrnující aktivaci nebo modifikaci nosiče a technologie izolačního postupu enzymu (cena preparátu) ve vztahu k dlouhodobé stabilitě a účinnosti opakovaně nebo kontinuálně využívaného imobilizovaného enzymu pro přípravu 6-APK. Při tomto způsobu výroby je předností dobrá kvalita 6-APK, prosté biologických příměsí, srovnatelná s chemickým způsobem výroby a podle některých údajů z časopisecké a patentové literatury, také jednoduchá izolace a dobrý výtěžek produktu.

Příprava 6-APK fyzikálně nebo chemicky imobilizovanými buňkami produkčních mikroorganismů obsahujícími penicilinacylázu. Tento způsob je zatím nejméně prozkoumán a pokud je známo, zatím není ve výrobním měřítku využíván. O způsob využití imobilizovaných enzymově aktivních buněk jako biokatalyzátorů je zejména v několika posledních letech nebývalý zájem (E.J. Vandamme, Chem. Ind., 1976, 1976) a to z evidentních ekonomických důvodů, neboť při tomto způsobu odpadá především náročná a ztrátová technologie čištění a izolace enzymu a větší ztráty jeho aktivity během imobilizace.

Je popsáno fyzikální uzavření mikrobiálních buněk obsahujících penicilinacylázu, a to nativních nebo částečně narušených toluenem, do agarových granulí (čs. patentový spis č. 113 908), dále nativních buněk do poly(akrylamidového) gelu (T. Sato, T. Tosa, I. Chibata, European J. Appl. Microbiol., 2, 153, 1976) nebo do vláken triacetátu celulósy (D. Dinelli, Proc. Biochem. 7, 9, 1972).

Uvedené způsoby nejsou výhodné z hlediska průmyslového využití, neboť při tomto způsobu je rychlost enzymové reakce silně limitována difuzí dvojí difuzní bariérou (gel a buněčná stěna),

dochází k nepříznivému vytvoření gradientu pH lokální kumulací produktů reakce (6-APK a kyseliny fenylactové) a tím k inhibici reakce, v důsledku čehož se snižuje reakční rychlost a stupeň hydrolýzy penicilínu a reakce se zastavuje obvykle na nízkém absolutním výtěžku (40 až 70 %) při poměrně nízkých koncentracích štěpeného penicilínu (1 až 4 %). Další nevýhodou fyzikálního uzavření nativních buněk do gelové matrice je, že buňky v průběhu opakovaného použití lysují, takže se z nich enzym spolu s balastními bílkovinami uvolňuje, čímž se snižuje rychlost a účinnost enzymové transformace a také kvalita produktu v důsledku obsažených bílkovin.

Dále je popsán chemický způsob imobilizace buněk mikroorganismů produkujících penicilinacylázu na umělé organické materiály. Vazba buněk na organický polymer syntetického původu se provádí smíšením s následnou chemickou reakcí buněk ve vodné suspenzi s nejčastěji sférickými částicemi polymeru (získanými cíleně vedenou polymerací), jež obsahuje skupiny chemicky aktivní ke skupinám povrchu buněk. Resultují polymerní částice, které nesou celé buňky připojené chemicky, pravděpodobně kovalentní vazbou. Chemický způsob imobilizace buněk různých mikroorganismů na umělé organické materiály vedoucí k preparátům použitelných k nejrozličnějším enzymovým transformacím je popsán v NSR patentovém spisu DOS 2 513 929 a rovněž je známý výhradně k přípravě 6-APK.

Postup imobilizace enzymově aktivních buněk podle NSR patentového spisu DOS 2 513 929 spočívá v reakci buněk s reaktivním monomerm a v následné polymeraci nebo kopolymeraci nebo s glycidylmethakrylátovým polymerem, popřípadě v kombinaci s kovalentní fixací enzymů uvnitř buněk vhodným bifunkčním činidlem.

Známy postup přípravy a využití pevného biokatalyzátoru k přeměně benzylpenicilinu na 6-APK spočívá ve vazbě hyperprodučních mutant *E. coli* obsahujících vysoké množství penicilinacylázy na sférické částice syntetických polymerů především na bázi methakrylaldehydu (aktivní aldehydové skupiny), glycidylmethakrylátu (aktivní epoxidové skupiny) apod., a to tak, že se polymer nejprve ošetří aminem, čímž se převede na příslušný aminopolymer a následně navázání buněk na povrch částice se provede pomocí bifunkčního činidla. Dlouhodobá enzymová stabilita a účinnost získaných preparátů imobilizovaných buněk při opakovaném použití pro hydrolýzu 7% (hmota/objem) vodných roztoků solí benzylpenicilinu na 6-APK v míchaném reaktoru a dobré sedimentační a mechanické vlastnosti umožňují průmyslové využití.

Zjistilo se nyní, že pro vazbu buněk s vysokým obsahem penicilinacylázy lze použít nejrozličnějších mikroorganismů nebo jejich fragmentů, které lze pro daný účel připravit cílenou kultivací. S výhodou lze použít odpadních materiálů mikroorganismů (odpadní biomasy) po fermentačních výrobcích jakéhokoli druhu. Např. lze použít odpadních kvasinek po výrobě piva, odpadního mycelia při výrobě antibiotik, aminokyselin, enzymů nebo odpadního buněčného materiálu v podstatě po jakémkoliv průmyslové biotransformaci. Postupem podle vynálezu lze tak mnohonásobně ekonomizovat výrobu 6-APK tímto způsobem, neboť cena buněk mikroorganismů jako nosiče je zanedbatelná ve srovnání s jakýmkoliv uměle připraveným nosičem syntetického nebo přírodního původu, v případě použití odpadní mikrobiální biomasy po většině výrob je převážně nulová, neboť s likvidací buněčného odpadu mají výrobní podniky, zvláště farmaceutické, často potíže, které řeší odvozem těchto materiálů do zemědělských podniků ke hnojení polí či k přidávání do krmných směsí, popřípadě spalováním.

Podstata vynálezu spočívá ve využití mikrobiálních buněk a jejich fragmentů jako nerozpust-

ných nosičů pro vazbu mikrobiálních buněk obsahujících požadovaný enzym, prostřednictvím do reakce vstupujícího bifunkčního činidla, glutar dialdehydu. Kovalentní vazba mezi buňkou vázanou a buňkou nebo jejím fragmentem mající charakter nerozpustného nosiče, vzniká převážně reakcí aminoskupin povrchu jedné buňky nebo jejího fragmentu s bifunkčním činidlem na jedné straně a tímto činidlem s aminoskupinou druhé buňky na straně druhé, přičemž dojde ke kovalentnímu zesílení a fixaci vnitrobuněčných bílkovin a tím i požadovaného enzymu v takto vzniklém mikrobiálním agregátu.

Kovalentní vazba je tedy uskutečněna bifunkčním činidlem, které reaguje především s aminoskupinami přirozeně se vyskytujícími aminopolymerů tvořících povrchové struktury mikrobiální buňky (buněčná stěna, cystoplasmatická membrána). U prokaryontních mikroorganismů, zejména bakterií, se této reakce účastní především mukopolymer (murein), u eukaryontních mikroorganismů především chitin a chitosan. Do reakce vstupují pravděpodobně i strukturální bílkoviny buněčných povrchů. Chemickou strukturu buněčných povrchů bohatou na aminoskupiny dostatečně popisují pro prokaryontní mikroorganismy, zejména bakterie, D.A. Reavley a R.E. Burge (v *Advan. Microbiol. Physiol.*, **7**, 2-71, ed. A.H. Rose & D.W. Tempest, Acad. Press, London N.Y., 1972), pro eukaryontní organismy, zejména plísňe a vyšší houby, J.M. Aronson (v *The Fungi*, **1**, 49-76, ed. G.C. Ainsworth & A.S. Sussman, Acad. Press, N.Y. & London, 1965). U těchto druhů organismů, kde je přirozeně se vyskytující aminopolymer tvořící integrální součást nerozpustné struktury povrchu buněk pro reakci s bifunkčním činidlem nedostupný, kryptický, např. u gramnegativních mikroorganismů (bakterií), lze buňky libovolným způsobem destruuovat a získat tak nerozpustné fragmenty buněk (ghosts), které lze již pro uvedený princip reakce podle vynálezu použít. Stejně tak je možno chemicky, např. trichloroctovou kyselinou předem ošetřit některé druhy mikroorganismů, např. z rodu *Bacillus*, kde je mureinová vrstva překryta polymerem složeným z derivátů teichoových kyselin. Rezultují dlouhá nahá nerozpustná dutá vlákna obsahující na povrchu prakticky čistý murein, na jejichž povrch lze pak buňky prostřednictvím bifunkčního činidla kovalentně vázat. Rovněž je možno předem ošetřit buněčný nosič biochemicky, enzymový natrávením, např. lysozymem, chitinázou. Konečně je možné prostřednictvím vhodného flokulačního činidla nebo jiných látek, účastnících se reakce s glutar dialdehydem, kovalentně vázat buňky navzájem.

Postupem podle vynálezu rezultují dobře sedimentující, nerozpustné, kovalentně zesílené mikrobiální agregáty tvořící integrální jednotky s vysokým stupněm zachycené požadované enzymové aktivity, které lze opakovaně použít pro enzymovou katalýzu.

Předmětem vynálezu jsou mikrobiální buněčné agregáty obsahující buňky s vysokým množstvím enzymu penicilinacylázy k přeměně penicilínu, zejména benzylpenicilínu na kyselinu 6-aminopenicilínovou, vyznačené tím, že sestávají z enzymově aktivních mikroorganismů chemicky vázaných prostřednictvím polyfunkčních aldehydů, s výhodou glutar dialdehydu, navzájem nebo na jiné buňky různých druhů organismů, kterými jsou buď celé, neporušené, nativní anebo fyzikálně, chemicky či biochemicky ošetřené buňky či nerozpustné fragmenty prokaryontních nebo eukaryontních buněk různé morfologie.

Mikrobiální buněčné agregáty podle vynálezu jsou dále vyznačeny tím, že celé, neporušené, nativní anebo fyzikálně, chemicky, či biochemicky ošetřené buňky či nerozpustné fragmenty prokaryontních nebo eukaryontních buněk jsou ve tvaru vláken, kulovitých, elipsoidních, popřípadě jiných útvarů o rozměrech 1,1 až 1 000 μm , či buněčných fragmentů těchto buněk vzniklých samovolnou

nebo uměle navozenou autolýzou, či jakýmkoliv jiným způsobem, navozeným rozrušením.

Při výrobě mikrobiálních buněčných agregátů se podle vynálezu postupuje tak, že se nechají reagovat celé neporušené, nativní anebo fyzikálně, chemicky či biochemicky ošetřené buňky či nerozpustné fragmenty prokaryontních nebo eukaryontních buněk různé morfologie s enzymově aktivními buňkami s penicilinacylázovou aktivitou a polyfunkčním aldehydem.

Reakci lze provádět v přítomnosti flokulačního činidla s výhodou flokulačního činidla, které má nejméně dvě primárně anebo sekundárně aminové skupiny vstupující do reakce.

Způsobem podle vynálezu lze postupovat také tak, že se enzymově aktivní buňky s penicilinacylázovou aktivitou nechají reagovat s polyfunkčním aldehydem, s výhodou glutardialdehydem v přítomnosti flokulačního činidla.

Výhodné je použít flokulační činidlo, které má nejméně dvě primární anebo sek. aminoskupiny vstupující do reakce.

Způsob podle vynálezu je dále vyznačený tím, že po reakci s polyfunkčním aldehydem, s výhodou glutardialdehydem se získané agregáty promyjí organickým rozpouštědlem neinaktivujícím penicilinacylázu, vybraným ze skupiny, sestávající z cyclohexanu, benzenu, benzinu, toluenu, xylenu, trichlormethanu, tetrachlormethanu, trichlorethanu, dichlorethanu, chlorbenzenu, methylesobutylketonu, cyclohexanonu, butylacetátu, popřípadě jejich směsí.

Při výrobě mikrobiálních buněčných agregátů podle vynálezu je možné použití odpadních buněk organismů nebo nerozpustných fragmentů z nich předem připravených či samovolně vzniklých.

Dále předmětem vynálezu je způsob přípravy mikrobiálních buněčných agregátů vyznačený tím, že se enzymově aktivní buňky s penicilinacylázovou aktivitou smísí s polyfunkčním aldehydem, s výhodou glutardialdehydem, načež se ochladí pod teplotu tání.

Při tomto způsobu lze s výhodou použít enzymově aktivních buněk s penicilinacylázovou aktivitou částečně autolyzovaných.

Dále je způsob přípravy mikrobiálních buněčných agregátů podle vynálezu, vyznačený tím, že se použije polyfunkčního aldehydu v množství 0,1 až 10 % hmotnostních (w/v).

Mikrobiální buněčné agregáty podle vynálezu obsahují buňky s vysokým množstvím enzymu penicilinacylázy k přeměně penicilínu, zejména benzylpenicilinu na kyselinu 6-aminopeniciliánovou, přičemž jsou enzymově aktivní mikroorganismy chemicky vázány navzájem nebo na jiné buňky různých druhů organismů, kterými jsou buď celé, neporušené, nativní anebo fyzikálně, chemicky či biochemicky ošetřené buňky či jejich nerozpustné fragmenty, přičemž vlastnosti těchto agregátů, zejména chemicky vysoce stabilizovaná enzymová aktivita a dobré sedimentační a mechanické vlastnosti, dovoluují dlouhodobé opakované nebo kontinuální použití na principu enzymového reaktoru, podle libovolné volby technologie s následnou izolací 6-aminopeniciliánové kyseliny úpravou pH a teploty z čiré kapaliny, resultující po jejich snadném oddělení z reakční směsi.

U mikrobiálních buněčných agregátů podle našeho vynálezu jsou enzymově aktivní buňky mikroorganismů anebo jejich enzymově aktivní nerozpustné fragmenty glutardialdehydem chemicky navázány na povrch celých, neporušených, nativních anebo fyzikálně, chemicky či biochemicky předem ošetřených prokaryontních nebo eukaryontních buněk různé morfologie, či fragmentů těchto buněk, vzniklých samovolnou nebo uměle navozenou autolýzou, či jakýmkoliv jiným způsobem navozeným rozrušením, čímž dojde nejen ke kovalentní vazbě mezi buňkami majícími charakter nosiče, nýbrž i ke kovalentnímu zesílení vnitrobuněčného obsahu celého buněčného agregátu a tím i k chemické fi-

xaci a stabilizaci penicilinacylázy a zamezení kontaminace vzniklé 6-aminopeniciliánové kyseliny biologickými příměsemi, zvláště bílkovinného charakteru.

Pro jejich přípravu lze použít buněk organismů nebo nerozpustných fragmentů z nich předem připravených či samovolně vzniklých, patřících mezi bakterie, zvláště gram pozitivní, gram negativní a aktinomycety, nižší a vyšší houby, zejména plísňe, kvasinky a vegetativní mycelia některých basidiomycet, vyjímaje všechny pathogenní mikroorganismy, rickettsie, mykoplasmata a viry.

Velikost, sedimentační vlastnosti a stupeň zachycené enzymové aktivity penicilinacylázy kovalentně zesítěných agregátů buněk jsou řízeny hmotnostním poměrem vázaných buněk ku buňkám nosiče či jejich nerozpustným fragmentům, přítomností či nepřítomností flokulačního činidla v reakční směsi, jeho kvalitou a koncentrací, dobou stání buněčné suspenze v přítomnosti flokulantu, hodnotou pH reakční směsi a reakční teplotou a použitou technikou kovalentního zesílení buněk glutardialdehydem, zahrnující stání, míchání o různé intenzitě, mražení a následné pomalé rozmrazování, lyofilizaci, sušení, nebo kombinaci těchto technik.

Obsahuje-li látka schopná způsobit flokulaci buněk nejméně dvě primární anebo sekundární aminoskupiny, vstupuje do reakce zprostředkované glutardialdehydem a má funkci mezibuněčné prostorové spojky.

Po reakci s glutardialdehydem získané buněčné agregáty se promyjí organickým rozpouštědlem neinaktivujícím penicilinacylázu v zesítěných agregátech, čímž dojde k vyplavení nezreagovaných lipoidních látek, které jsou součástí struktury buněčných povrchů, buněčných stěn a cytoplasmatických membrán, a tím ke zdokonalení difuzních vlastností těchto agregátů.

Způsobem podle vynálezu bylo použito k přípravě mikrobiálních buněčných agregátů hyperproduční mutanty *Escherichia coli* - 77 obsahující vysoké množství penicilinacylázy, která byla získána genetickou manipulací postupem podle čs. autorského osvědčení č. 162 274; kmen je chráněn podle čs. autorského osvědčení č. 188 631. Je samozřejmé, že použitím jiného produkčního mikroorganismu (kmene) lze podle vynálezu připravit agregáty s odlišným kvalitativním a kvantitativním zastoupením enzymových aktivit.

Velikost mikrobiálních agregátů byla posuzována mikroskopicky (optickým mikroskopem) s použitím kalibrovaného měrného okuláru při různém zvětšení. Některé agregáty byly posuzovány scann-elektronovým mikroskopem. Sedimentační vlastnosti byly hodnoceny buď centrifugací při definované relativní centrifugační síle a době (obvykle 500 G, 5 min. a méně), nebo použitím sedimentační hematologické soupravy běžně užívané při vyšetřování sedimentace krevních tělísek po odeběru krve v humánní medicíně (FW test), popřípadě sedimentací stáním v odměrném válci.

Stabilita enzymové aktivity mikrobiálních agregátů byla hodnocena dlouhodobým třepáním vodné suspenze těchto agregátů (obvykle 10 g vlhké hmoty/100 ml) při teplotě 30 °C v 500 ml varných baňkách umístěných na rotačním třepacím stroji o počtu otáček 240/min. Ve zvolených časových intervalech byly odebírány vzorky suspenze a hodnocena enzymová aktivita v sedimentu a supernatantu.

V některých případech byly hodnoceny mechanické vlastnosti mikrobiálních agregátů dlouhodobým třepáním vodné suspenze těchto agregátů za výše uvedených podmínek s tím rozdílem, že baňky byly opatřeny jedním nebo několika vlisy (zarážkami). Mimo enzymovou aktivitu sedimentu a supernatantu byla měřena rychlost sedimentace a průměrná velikost agregátů po vystavení mechanickým vlivům.

Aktivita penicilinacylázy byla hodnocena spektrofotometricky barevnou reakcí p-dimethylaminobenzaldehydu s 6-APK podle čs. patentového spisu č. 116 959 v modifikaci podle Balasinghama a sp. (Biochim. Biophys. Acta, 276, 250, 1972), při 42 °C a hodnotě pH 7,6 v oblasti reakční kinetiky nultého řádu. Jednotka enzymové aktivity je takové množství enzymu, které katalyzuje vznik jednoho umolu 6-APK z benzylpenicilinu, respektive jeho solí za hodinu.

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

Příklady provedení

Příklad 1

Submerzní kultivací asporogenního kmene *Bacillus megatherium* CCM 2037 ve 150 l fermentačním tanku při teplotě v rozmezí 40 až 48 °C v přítomnosti vysokých koncentrací aminokyselin (ve formě kukuřičného extraktu) postupem podle J. Chaloupky a sp., (Biotechnol. and Bioeng. Symp. No. 4, 985 až 993, 1974) bylo získáno přibližně 3 000 g buněčné hmoty. Tímto způsobem bylo docíleno tvorby velmi dlouhých vláken uvedeného kmene.

2 000 g takto získané nativní buněčné hmoty bylo suspendováno ve 2 000 ml vody, za míchání zahřáto na 64 °C a přidáno 4 000 ml 10% (w/v) kyseliny trichloroctové předehřáté na 62 °C. Směs byla za míchání ohřáta na 80 °C a při této teplotě zahřívána 20 minut. Poté byla směs ochlazená na 30 °C, suspenze buněk odstředěna a buněčná hmota promyta 25 l vody. Takto bylo získáno 1010 g vlhké buněčné hmoty ve formě pasty; velikost vláken se pohybovala v rozmezí 15 až 30 μm.

7,5 g vlhké hmoty popsaným způsobem získané a ošetřené buněčné pasty *B. megatherium* bylo spolu s 15 g vlhké hmoty buněk *E. coli* - 77 obsahujících penicilinacylázu suspendováno v 50 ml 0,1M fosfátového pufru, pH 7,0 v erlenmayerově baňce a přidány 4 ml 50% roztoku glutardialdehydu. Baňka s reakční směsí byla umístěna na reciproký třepací stroj o počtu kyvů 200/min. při teplotě 27,5 °C po dobu 3 hodin. Poté byla reakční směs zředěna 6x vodou, odstředěna (1000 G, 5 min.) a sediment suspendován do 250 ml vody a suspenze znovu odstředěna (5000 G, 10 min.).

Popsaným postupem bylo získáno 23 g vlhké hmoty (ve formě pasty) mikrobiálních agregátů obsahujících 49,4 % původní aktivity penicilinacylázy o specifické aktivitě enzymu 2,32 j/mg vlhké hmoty preparátu. Velikost agregátů činila průměrně 25 μm.

2,5 g vlhké hmoty agregátů suspendované v 50 ml vody kvantitativně sedimentovaly při 100 G, 5 min. (čirý supernatant).

Vodná suspenze získaných agregátů (15 g pasty/50 ml) byla emulgována ve 100 ml toluenu v poměru 1:4 (v/v) obsahujícím 2 % (v/v) smáčedla (SPAN-85) a tato emulze byla míchána v 500 ml varné baňce se třemi vlisy (zarážkami) na rotačním třepacím stroji (240 ot/min.) 3 hodiny při 28 °C. Emulze byla odstředěna (5000 G, 10 min.) a sediment byl 2x promyt 50 ml 10% (v/v) vodného roztoku smáčedla (Tween-20) a 2x 250 ml vody; suspenze odstředěna vždy 15 minut při 5000 G. Specifická aktivita enzymu popsaným způsobem ošetřených agregátů činila 3,45 j/mg vlhké hmoty, tj. 149 % hodnoty specifické aktivity neošetřených agregátů.

Příklad 2

Za 300 g vlhké pasty nativních (neošetřených) buněk *Bacillus megatherium* získané kultivací podle příkladu 1 bylo připraveno 1000 ml suspenze v 0,05 % (w/v) NaCl a její pH upraveno na hodnotu 7,0. Po ohřátí suspenze na 36 °C bylo přidáno 0,2 g vaječného lysozymu a směs při této teplotě míchána 30 minut, poté byla hodnota pH upravena na 9,0 25% roztokem NaOH a směs prudce ohřáta na 80 °C a zahřívána ještě 10 minut při této teplotě. Směs byla ochlazená na 30 °C a hodnota pH upravena konc. kyselinou chlorovodíkovou na 7,0.

Z 10 g této suspenze a 10 g vlhké pasty buněk *E. coli* - 77 obsahujících penicilinacylázu bylo připraveno 50 ml vodné suspenze a její pH upraveno na hodnotu 7,6 50% (w/v) roztokem NaOH a přidány 2 ml 50% roztoku glutaraldehydu. Reakční směs byla míchána na recipročním třepacím stroji (200 kmitů/min.) 6 hodin při teplotě 29 °C, poté zředěna 2x vodou a odstředěna (500 G, 10 min.); sediment byl rozmíchán ve 200 ml vody a znovu odstředěn (5000 G, 15 min.).

Popsaným způsobem získaná vlhká pasta agregátů obsahovala 24,9 % původní aktivity penicilinacylázy; specifická aktivita enzymu činila 1,44 j/mg vlhké hmoty preparátu. Agregáty vykazovaly průměrnou velikost 110,4 μm a k jejich úplné sedimentaci vedlo odstředění při 500 G po dobu 10 minut (čirý supernatant).

Příklad 3

Buněčná pasta *B. megatherium* ošetřená kyselinou trichloroctovou podle příkladu 1, byla v množství 10 g vlhké hmoty smíchána s 20 g pasty buněk *E. coli* obsahujících penicilinacylázu a ze směsi připraveno 200 ml vodné suspenze, jejíž hodnota pH byla upravena na 7,9 50% roztokem NaOH. K suspenzi bylo přidáno 20 ml 10% vodného roztoku (w/v) Sedipuru^R KA, zamícháno a ponecháno 18 hodin stát při teplotě +8 °C. Po této době byla hodnota pH upravena na 7,4 25% roztokem NaOH a do suspenze vmícháno 16 ml 25% roztoku glutaraldehydu; směs ponechána stát 3 hodiny při teplotě 24,5 °C, poté bylo přidáno 100 ml vody, suspenze odstředěna (500 G 10 min.) a sediment suspendován v 1000 ml vody a zfiltrován přes sílonovou tkaninu o velikosti ok 500 μm. Agregáty zachycené na filtru byly suspendovány ve 200 ml vody a odstředěny (5000 G, 15 min.).

Získaný preparát (56,2 g vlhké hmoty) obsahoval agregáty o velikosti průměrně 1400 μm o specifické aktivitě enzymu 0,99 j/mg vlhké hmoty; zachycená aktivita činila 30,5 % původní aktivity penicilinacylázy. Střední vodné suspenze (10 g/100 ml) agregátů v odměrném válci vedlo ke kvantitativní sedimentaci během 5ti minut.

U popsaným způsobem získaných agregátů byla testována stabilita enzymové aktivity spolu s mechanickými vlastnostmi při dlouhodobém míchání vodné suspenze 10 g vlhké hmoty agregátů (100 ml v 500 ml varné baňce) opatřené jedním vlisem (zarážkou) tak, jak je uvedeno v popisu vynálezu. Za 60 dní klesla počáteční aktivita sedimentu na 98,5 % a v supernatantu se objevil slabý zákal; za uvedenou dobu nepřetržitého míchání činila velikost agregátů průměrně 1000 μm a rychlost sedimentace byla o něco pomalejší, (čirý supernatant rezultoval stáním v odměrném válci za 10 minut).

Příklad 4

Buněčná pasta *E. coli* obsahující penicilinacylázu byla suspendována ve vodě na hodnotu 400 mg vlhké hmoty/ml a tato suspenze byla desintegrována čtyřnásobnou recyklací na mechanickém des-

integrátoru Manton-Gaulin při tlaku 340 kp/cm^2 při laboratorní teplotě. Homogenát byl odstředěn (5000 G/1 h).

10 g vlhké hmoty fragmentů *E. coli* bylo ve směsi s 20 g vlhké hmoty neporušených buněk *E. coli* téhož kmene obsahujících penicilinacylázu suspendováno ve vodě na výsledný objem 200 ml. Hodnota pH suspenze byla upravena 25% roztokem NaOH na 7,5 a suspenze byla po smíšení s 16 ml 25% roztoku glutardialdehydu vpravena do 500 ml varné baňky a umístěna na rotační třepací stroj. Reakce probíhala za míchání (240 ot/min) 3 hodiny při teplotě 26°C . Poté byla reakční směs zředěna 100 ml vody a odstředěna (500 G , 5 min), sediment promyt 250 ml vody a znovu odstředěn (5000 G , 15 min).

V takto získaném preparátu mikrobiálních agregátů (41,5 g vlhké hmoty) bylo zachyceno 81 % původní aktivity penicilinacylázy, specifická aktivita enzymu činila $1,80 \text{ j/mg}$ vlhké hmoty preparátu. Velikost agregátů byla průměrně $320 \mu\text{m}$ a jejich úplné sedimentace bylo docíleno stáním suspenze ve válci (5 g vlhké hmoty agregátů/100 ml) po dobu 10 minut. Dále byla sledována stabilita enzymové účinnosti agregátů podobně jako v příkladu 3; baňka nebyla však opatřena vlisem. Po 40 dnech nepřetržitého míchání nedošlo k poklesu enzymové aktivity v sedimentu a čirý supernatant vykazoval nulovou aktivitu.

Katalytická účinnost mikrobiálních agregátů byla ověřena při opakovaně prováděné hydrolýze benzylpenicilinu. Množství 10 g vlhké hmoty popsaným způsobem připravených agregátů bylo vpraveno do 100 ml míchaného reaktoru a doplněno na 50 ml vodou. Teplota během enzymové hydrolýzy byla udržována na 37°C a prováděna kontinuální úprava pH na hodnotu 7,6 čpavkovou vodou. Agregáty byly vždy odděleny z reakční směsi odstředěním (500 G , 5 min) a použity pro další opakovaný cyklus enzymové konverze. Za uvedených podmínek byla účinnost konverze 6,25% roztoku Na-soli benzylpenicilinu na 6-APK 82,3 % za 1 1/2 hodiny pro první cyklus, 81,5 % za 1 1/2 hodiny pro 2. cyklus a 82,6 % za 1 1/2 hodiny pro 3. cyklus opakovaného použití.

Příklad 5

Z 10 g vlhké hmoty nativních buněk *E. coli* obsahujících penicilinacylázu a 5 g vlhké hmoty fragmentů buněk *E. coli* téhož kmene získaných postupem uvedeným v příkladu 4, bylo připraveno 50 ml vodné suspenze, jejíž pH bylo upraveno na hodnotu 7,5. K této suspenzi bylo přidáno 2 ml 10% (w/v) vodného roztoku Sedipuru^R KA a vmícháno 4 ml 25% roztoku glutardialdehydu a směs nalita na kovový táč z nerezové oceli v tenké vrstvě. Vrstva byla ponechána 15 minut při laboratorní teplotě, dále pak 3 hodiny při teplotě -20°C a nakonec pomalu rozmrazována 16 hodin při teplotě 8°C . Získaná hmota byla za vlhka rozřezána a útvary smíchány se 100 ml vody. Poté byly částice homogenizovány 1 minutu velmi intenzivním mícháním ocelovým vrtulovým míchadlem a homogenát odstředěn (500 G , 5 min). Sediment byl suspendován v 500 ml vody a filtrován přes kovové síto z nerezové oceli (průměr ok $0,7 \text{ mm}$). Zachycené agregáty byly ze síta smyty 250 ml vody a odstředěny (5000 G , 15 min).

Popsaným způsobem získané mikrobiální agregáty vykazovaly průměrnou velikost $1750 \mu\text{m}$ a kvantitativně sedimentovaly při stání suspenze (2,5 g vlhké hmoty agregátů/50 ml) za 5 minut. Zachycená enzymová aktivita preparátu byla 34,3 % při specifické aktivitě $1,23 \text{ j/mg}$ vlhké hmoty. 5,5 g vlhké hmoty těchto agregátů bylo suspendováno ve vodě na celkový objem 100 ml a vpraveno do 500 ml varné baňky s jedním vlisem a způsobem uvedeným v příkladu 3 byla sledována stabilita

aktivity penicilinacylázy a mechanické vlastnosti agregátů. Po 30ti dnech nepoklesla enzymová aktivita v sedimentu; slabě opalescentní supernatant nevykazoval enzymovou aktivitu a agregáty o průměrné velikosti 1200 μm sedimentovaly za výše uvedených podmínek zcela za 10 minut.

Příklad 6

Vlhký odpadní buněčný materiál *Streptomyces rimosus* po výrobě oxytetracyklinu (1500 g vlhké hmoty) byl promyt 20ti litry vody a odstředěn na poloprovozní centrifuze Sharples s výtěžkem 1300 g vlhké hmoty tohoto materiálu.

10 g vlhké hmoty těchto nativních promytých buněk a 20 g vlhké hmoty buněk *E. coli* obsahujících penicilinacylázu bylo rozmícháno ve vodě na celkový objem 200 ml; k suspenzi bylo přidáno 16 ml 25% roztoku glutaralddehydu. Reakční směs byla pomalu míchána kovovým vrtulovým míchadlem (400 ot/min) 3 hodiny při teplotě 20,5 °C, přičemž bylo pH reakční směsi udržováno 10% roztokem NaOH pomocí pH-statů na hodnotě 7,0. Po této době byla suspenze zředěna přidáním 100 ml vody a odstředěna (500 G, 5 min); sediment byl dvakrát promyt 250 ml vody a odstředěn (5000 G, 15 min). Popisným způsobem bylo získáno 24,2 g vlhké hmoty mikrobiálních agregátů. Zachycená aktivita penicilinacylázy v tomto preparátu činila 28,6 %, specifická aktivita enzymu byla 1,52 j/mg vlhké hmoty preparátu. Agregáty ve vodné suspenzi 5 g vlhké hmoty/100 ml kvantitativně sedimentovaly po 5ti minutách stání; jejich velikost se pohybovala průměrně okolo 450 μm .

Za podmínek uvedených v příkladu 3 byla testována stabilita enzymu u těchto agregátů s tím rozdílem, že varná baňka nebyla opatřena vlisem. Po 28 dnech míchání nebyl zjištěn pokles aktivity enzymu v sedimentu, přičemž ve slabě zakaleném supernatantu bylo zjištěno 5,9 % výchozí enzymové aktivity suspenze.

Dále bylo použito 50 ml suspenze, která obsahovala 5 g vlhké hmoty agregátů ve vodě k jednorázové enzymové hydrolýze 6,25 % (w/v) roztoku Na-soli benzylpenicilinu na 6-APK, za podmínek uvedených v příkladu 4 s teoretickým výtěžkem 73,5 % 6-APK za 2 hodiny.

Příklad 7

Vlhká pasta buněk *Streptomyces rimosus* získaná promytím odpadního buněčného materiálu, jak je uvedeno v příkladu 6, byla v množství 900 g rozmíchána v 1100 ml vody a po ohřítí této suspenze na 30 °C bylo přidáno 2000 ml 10% (w/v) roztoku kyseliny trichloroctové předešlé na teplotu 80 °C; směs byla zahřata na teplotu 80 °C za pomalého míchání a při této teplotě udržována ještě 15 minut. Ke směsi byly přidány 4 l studené vody a buňky separovány odstředěním na poloprovozní odstředivce Sharples. Buněčná hmota byla promyta 20 l vody a odstředěna na témže zařízení do formy buněčné pasty.

2,5 g vlhké hmoty této pasty a 5 g vlhké pasty buněk *E. coli* s penicilinacyláзовou aktivitou bylo suspendováno ve vodě na celkový objem 50 ml; hodnota pH suspenze byla upravena na 7,25 a přidán 10% (w/v) vodný roztok Sedipuru^R KA tak, aby jeho výsledná koncentrace v reakční směsi byla 0,5 % w/v. Směs byla krátce pomalu zamíchána a poté při stání po dobu 30ti minut probíhala flokulace. Hodnota pH flokulované suspenze byla opět upravena na 7,25 a přidáno 2 ml 50% roztoku glutaralddehydu a reakční směs byla umístěna na reciproký třepací stroj (200 kyvů/min); reakce probíhala 4 1/2 hodiny při teplotě 29 °C. Po této době byla reakční směs zředěna 2x vodou a odstředěna (500 g, 10 min), sediment byl suspendován ve 200 ml vody a znovu odstředěn

(5000 G, 15 min).

Popsaným způsobem bylo získáno 18,6 g vlhké hmoty agregátů; zachycená aktivita penicilinacylázy činila 67 %, specifická aktivita enzymu byla 1,35 j/mg vlhké hmoty preparátu. Velikost agregátů se pohybovala přibližně okolo 300 μ m a při navážce 2,5 g vlhké hmoty agregátů/50 ml vody byla jejich sedimentační rychlost měřená pomocí haematologické soupravy (MPW - 01, Polsko), 15,5 mm/min.

Příklad 8

Ze 2 g vlhké hmoty buněk *E.coli* obsahujících penicilinacylázu a 1 g vlhké hmoty promytého odpadního buněčného materiálu (nativní biomasy) *Streptomyces rimosus*, bylo připraveno 10 ml vodné suspenze, jejíž pH bylo upraveno na hodnotu 7,6 a přidáno 0,8 ml 25% roztoku glutardialdehydu. Směs byla po zamíchání nalita na Petriho misku o průměru 9,5 cm, ponechána stát 15 minut při laboratorní teplotě, pak 3 hodiny při teplotě -20°C a poté ponechána 16 hodin při teplotě $+8^{\circ}\text{C}$ stát. Po této době byla hmota rozrušena velmi intenzivním mícháním ve 150 ml vody ocelovým vrutlovým míchadlem 1 minutu a odstředěna (500 g, 5 min), sediment suspendován ve stejném objemu vody a znovu odstředěn (5000 G, 10 min).

Získaný preparát mikrobiálních agregátů o specifické aktivitě penicilinacylázy 2,22 j/mg vlhké hmoty a o zachycené aktivitě enzymu 34,2 % byl umístěn ve vodné suspenzi (3,8 g vlhké hmoty agregátů/100 ml) do 500 ml varné baňky bez vlisu a testována stabilita enzymové aktivity jak je uvedeno v příkladu 3. Po 14 dnech nepřetržitého míchání klesla aktivita sedimentu na 93,3 % původní enzymové aktivity; supernatant byl čirý a aktivita penicilinacylázy v něm byla nulová.

Příklad 9

Odpadní buněčný materiál (5 l řídké suspenze) *Penicillium chrysogenum* po výrobě penicilínu byl promyt 25 l vody a vlhký koláč dobře odsát. Bylo získáno 550 g vlhké pasty buněčného materiálu. Z 10 g této vlhké pasty a 30 g vlhké pasty buněk *E.coli* obsahujících penicilinacylázu bylo připraveno 200 ml suspenze v 0,1 M fosfátovém pufru, pH 7,5. K homogenní suspenzi bylo přidáno 16 ml 50% roztoku glutardialdehydu a mícháno 1,5 hodiny při teplotě 24°C na rotačním třepacím stroji (240 ot/min). Reakční směs byla zředěna vodou na dvojnásobek objemu a odstředěna (500 G, 5 min); sediment byl suspendován v 300 ml vody a opět odstředěn (5000 G, 15 min).

Popsaným způsobem získaný preparát vykazoval specifickou aktivitu enzymu 2,20 j/mg vlhké hmoty, zachycená aktivita penicilinacylázy byla 43,5 %. Velikost agregátů se pohybovala průměrně okolo 220 μ m a k úplné sedimentaci agregátů (suspenze 100 mg vlhké hmoty/ml) vedlo k odstředění při 500 G (5 min).

Testování stability penicilinacylázy u získaných agregátů (5 g vlhké hmoty/100 ml) probíhalo stejně, jak je uvedeno v příkladu 8. Po 20ti dnech nepřetržitého míchání nedošlo k poklesu enzymové aktivity sedimentu; v čirém supernatantu nebyla nalezena žádná enzymová aktivita.

Vlhká pasta agregátů o hmotě 15 g byla ošetřena směsným organickým rozpouštědlem, podobně jako v příkladu 1. Tentokrát však 50 ml butylacetátu obsahujícího 1 % (v/v) smáčedla (SPAN 85) a s tím rozdílem, že třepání emulze probíhalo 2 hodiny a že sediment byl promyt 1x100 ml 2,5% (v/v) roztoku smáčedla (TWEEN 20) a 3x250 ml vody. Ošetřené agregáty měly specifickou aktivitu penicilinacylázy 3,67 j/mg vlhké hmoty, tj. 167 % specifické aktivity neošetřených agregátů.

Příklad 10

Ke 200 ml homogenní vodné suspenze obsahující 20 g vlhké hmoty buněk *E.coli* s penicilinacylá-zovou aktivitou a 10 g vlhké hmoty promytých odpadních buněk *Penicillium chrysogenum* bylo při-dáno po úpravě pH na hodnotu 6,8 10 ml 10% (w/v) vodného roztoku Sedipuru^R KA. Za pomalého mí-chání ponecháno flokulovat 25 minut, poté bylo pH upraveno na hodnotu 7,1 a přidáno 16 ml 25% roztoku glutardialdehydu; následné míchání probíhalo na reciprokém třepacím stroji (200 kyvů/min) 6 hodin při teplotě 28 °C. Po této době bylo k suspenzi přidáno 100 ml vody a dále po-stupováno stejným způsobem, jak je uvedeno v příkladu 9.

Bylo získáno 62,4 g vlhké hmoty agregátů, v nichž zachycená enzymová aktivita činila 52,6 % a jejich specifická aktivita byla 1,24 j/mg vlhké hmoty preparátu. Velikost agregátů se pohybova-la průměrně okolo 350 μm, přičemž k jejich úplné sedimentaci, provedené stáním suspenze 5 g vln-ké hmoty/100 ml v odměrném válci, došlo za 20 minut.

Stabilita enzymové aktivity agregátů (suspenze 15 g vlhké hmoty/100 ml) byla sledována stejně jako v příkladu 9; po 60ti dnech nepřetržitého míchání nedošlo k poklesu aktivity penicilinacy-lázy v sedimentu, supernatant byl čirý a jeho enzymová aktivita byla nulová.

Příklad 11

Směs vlhkých past buněk *E.coli* obsahujících penicilinacylázu (10 g) a odpadních promytých bu-něk *Penicillium chrysogenum* (10 g), byla doplněna vodou na objem 200 ml a po homogenizaci upra-vena hodnota pH suspenze na 7,1. K této suspenzi bylo přidáno 20 ml 2% (w/v) vodného roztoku Praestolu^R 444 K. Po přidání flokulantu byla suspenze intenzivně míchána a poté míchána pomalu 20 minut. Po této době bylo upraveno pH flokulované suspenze na hodnotu 7,4 a za míchání přidá-no 16 ml 25% roztoku glutardialdehydu. Reakční směs byla umístěna na reciproký třepací stroj (200 kyvů/min); reakce probíhala při teplotě 31 °C po dobu 3 hodin. Po této době byla suspenze zředěna 100 ml vody a odstředěna (5000 G, 10 min). Sediment byl rozmíchán v 500 ml vody a homo-genní suspenze filtrována přes středně porézní filtrační papír; vlhký koláč byl intenzivně va-kuově odsát.

Popsaným způsobem získané agregáty měly specifickou aktivitu penicilinacylázy 1,05 j/mg vlhké hmoty při zachycené aktivitě enzymu 55,5 %; jejich velikost činila průměrně 650 μm a ke kvan-titativní sedimentaci došlo stáním suspenze (10 g vlhké hmoty/100 ml) v odměrném válci za 20 minut. Agregáty bylo možno velmi dobře oddělit filtrací přes středně nebo široko porézní filtrač-ní papír.

Test stability enzymové aktivity agregátů byl prováděn za podmínek uvedených v předchozích příkladech (příklady 8, 9 a 10). Po 30ti dnech nepřetržitého míchání suspenze agregátů (15 g vlhké hmoty/200 ml) byl supernatant čirý, neopalescentní, s nulovou enzymovou aktivitou. K pokle-su aktivity penicilinacylázy v sedimentu nedošlo.

Příklad 12

Přibližně 1000 g odpadního buněčného materiálu *Saccharomyces carlsbergensis* po výrobě fenyl-acetylkarbinolu bylo suspendováno v 10 l vody a po 15 minutách míchání byl materiál odstředěn; bylo získáno 600 g vlhké hmoty promytých odpadních kvasinek.

Ze 2,5 g této vlhké pasty a 7 g vlhké pasty buněk *E.coli* obsahujících penicilinacylázu bylo

připraveno 50 ml homogenní suspenze, jejíž pH bylo upraveno na hodnotu 7,4. Do této suspenze byl přidán 1 ml 50% roztoku glutardialdehydu a směs míchána 6 hodin na reciprokém třepacím stroji (200 kyvů/min) při teplotě 29,5 °C. Potom byla směs zředěna 2x vodou, odstředěna (500 G, 10 min), sediment suspendován v 200 ml vody a znovu odstředěn (5000 G, 15 min).

Specifická aktivita penicilinacylázy u tohoto preparátu byla 2,28 j/mg vlhké hmoty a zachycená aktivita enzymu činila 60,4 %. Sedimentační rychlost agregátů o jejich průměrné velikosti 450 μm, měřená sedimentací suspenze agregátů (0,05 g vlhké hmoty/ml) pomocí haematologické soupravy (MPW-01, Polsko), byla 16,5 mm/min.

Vodná suspenze (10 g vlhké hmoty agregátů/25 ml) byla emulgována ve 100 ml směsného rozpouštědla chloroform-cyklohexan 1:4 (v/v) obsahující 2 % (v/v) smáčedla (Span 85) a emulze intenzivně míchána 3 hodiny při laboratorní teplotě. Po této době byla emulze odstředěna (5000 G, 10 min) a sediment důkladně promyt 100 ml 10% (v/v) vodného roztoku smáčedla (Tween 20). Po oddělení roztoku smáčedla byl sediment 2x promyt 250 ml vody a vždy odstředěn (500 g, 5 min. a 5000 G, 15 min).

Popsaným způsobem bylo získáno 6,2 g vlhké hmoty ošetřených agregátů, jejichž specifická aktivita činila 131 % aktivity původní (2,98 j/mg vlhké hmoty).

Příklad 13

V homogenní suspenzi o objemu 200 ml obsahující 10 g vlhké pasty odpadních buněk *Sacch. carlsbergensis* získané a promyté jak je uvedeno v příkladu 12, a 40 g vlhké pasty buněk *E. coli* s penicilinacyláзовou aktivitou, bylo upraveno pH na hodnotu 7,7 a vmícháno 20 ml 10% (w/v) vodného roztoku Sedipuru^R KA. Suspenze ponechána flokulovat 20 hodin při teplotě 8 °C a potom pH upraveno na hodnotu 7,8. Po přidání 32 ml 25% roztoku glutardialdehydu byla směs míchána na rotačním třepacím stroji (240 ot/min) 3 hodiny při teplotě 28 °C. Po této době byla reakční směs zředěna 100 ml vody a odstředěna (500 G, 5 min), sediment byl rozmíchán v 1000 ml vody a suspenze filtrována přes silonovou tkaninu o velikosti ok 350 μm. Agregáty byly z povrchu tkaniny smyty 200 ml vody a suspenze odstředěna (5000 G, 15 min).

Popsaným způsobem bylo získáno 86,8 g vlhké hmoty agregátů o zachycené aktivitě penicilinacylázy 34,8 %, specifické aktivitě enzymu 2,1 j/mg vlhké hmoty a o jejich průměrné velikosti 750 μm.

Z 10 g vlhké hmoty agregátů bylo připraveno 100 ml suspenze ve vodě a vpraveno do 500 ml baňky opatřené třemi vlisy (zarážkami). Stabilita enzymové aktivity a mechanické vlastnosti byly zjišťovány jak je uvedeno v příkladu 3. Za 36 dní nepřetržitého míchání nepoklesla aktivita sedimentu, supernatant byl čirý a jeho enzymová aktivita byla nulová. Průměrná velikost agregátů činila 600 μm, sedimentační vlastnosti zůstaly zachovány (10 g vlhké hmoty agregátů kvantitativně sedimentovalo stáním v odměrném válci za 5 minut).

Dále byla u popsáným způsobem získaných agregátů zjišťována katalytická účinnost při opakovaně provedené hydrolýze benzylpenicilinu na 6-APK tak, jak je uvedeno v příkladu 4, s tím rozdílem, že bylo použito suspenze agregátů 13,5 g vlhké hmoty/50 ml vody a že výchozí koncentrace Na-soli benzylpenicilinu činila 7 % (w-v). Za těchto podmínek proběhl 1. cyklus konverze za 1 l/2 hodinu s účinností 89,1 % a 2. cyklus s účinností 91,4 % teoretického výtěžku 6-APK za 2 hodiny.

Příklad 14

Nepromytý odpadní buněčný materiál *Sacch. carlsbergensis* po výrobě piva ve formě vlhké pasty, v množství 20 g spolu se 40 g vlhké pasty buněk *E. coli* obsahujících penicilinacylázu byl použit k přípravě 400 ml směsné suspenze, jejíž pH bylo upraveno na hodnotu 7,55. K této homogenní suspenzi bylo přidáno 40 ml 2% (w/v) vodného roztoku flokulantu Praestol^R 444 K a směs byla pomalu míchána 20 minut. Potom bylo přidáno 32 ml 25% roztoku glutardialdehydu a za pomalého míchání míchadlem s ocelovou vrtulí bylo pH reakční směsi udržováno 10% (w/v) roztokem NaOH pomocí pH-statku na hodnotě 6,9 po dobu 26 hodin při teplotě 10 °C. Po této době byla reakční směs zředěna 250 ml vody a odstředěna (500 G, 5 min); sediment byl suspendován v 600 ml vody a opět odstředěn (5000 G, 15 min).

Takto připravené agregáty obsahovaly v celkovém množství 90,4 g vlhké hmoty 52 % zachycené aktivity penicilinacylázy, jejich specifická aktivita enzymu byla 1,14 j/mg vlhké hmoty a jejich velikost byla průměrně 870 μm.

V suspenzi 10 g vlhké hmoty agregátů/100 ml vody došlo ke kvantitativní sedimentaci stáním v odměrném válci za 10 minut. Se suspenzí těchto agregátů (15 g/200 ml) byl proveden test stability enzymové aktivity stejně jak je uvedeno v příkladu 11. Po 60ti dnech nepřetržitého míchání nedošlo k poklesu aktivity sedimentu a aktivita čirého, neopalescentního supernatantu byla nulová.

S 50 ml vodné suspenze obsahující 10 g vlhké hmoty popsaným způsobem získaných agregátů byly provedeny 2 opakované konverze 5% (w/v) roztoku Na-soli benzylpenicilinu za stejných podmínek jako v předchozím příkladu, vyjma toho, že preparát byl z reakční směsi po 1. konverzi oddělen filtrací přes široko porézní filtrační papír a odsát; účinnost 1. konverze byla 87,5 % za 2 hodiny a 2. konverze 90,4 % teoretického výtěžku 6-APK za 1 1/2 hodiny.

Příklad 15

Z 800 g vlhké nepromyté odpadní pasty buněk *Sacch. carlsbergensis* po výrobě fenylacetylkarbinolu bylo připraveno 2000 ml suspenze, která byla homogenizována na mechanickém desintegrátoru Manton-Gaulin 10ti násobnou recyklací při tlaku 520 kp/cm².

Směs 2,5 ml takto připravené suspenze fragmentů kvasničných buněk a 2 g vlhké pasty buněk *E. coli* obsahujících penicilinacylázu byla doplněna vodou na celkový objem 10 ml, po dokonalém rozmíchání bylo upraveno pH suspenze na hodnotu 7,6. Poté bylo vmícháno 0,8 ml 25% roztoku glutardialdehydu a směs rozlita na Petriho misku o průměru 9,5 cm a ponechána stát 15 minut při laboratorní teplotě. Reakční směs byla poté umístěna do mrazicího boxu a při teplotě -20 °C ponechána po dobu 3 hodin; po této době byla umístěna na 16 hodin při teplotě +8 °C do komorové lednice. Vzniklá houbovitá hmota byla rozřezána, homogenizována velmi intenzivním mícháním ocelovým vrtulovým míchadlem po dobu 1 minuty a 2x promyta 150 ml vody; agregáty byly vždy odstředěny (500 G, 5 min).

Zachycená aktivita penicilinacylázy u získaných vlhkých agregátů činila 20,7 % a specifická aktivita enzymu byla 1,07 j/mg vlhké hmoty. U agregátů v suspenzi 4,1 g/100 ml byla sledována stabilita enzymové aktivity stejně, jak je uvedeno v příkladu 8. Aktivita sedimentu klesla po 30ti dnech nepřetržitého míchání na 84,3 % původní aktivity enzymu; supernatant byl čirý a jeho enzymová aktivita byla nulová.

Příklad 16

Vlhké odpadní mycelium dřevokazné basidiomycety *Oudemansiella mucida*, 1 litr kašovité biomasy, po výrobě antibiotika mucidinu, bylo vakuově zfiltrováno na skleněné fritě SI a 3x promyto 2,5 l vody, čímž byl získán vlhký koláč dobře odsátých vláken vegetativního mycelia. K 10 g vlhké hmoty tohoto mycelia bylo přidáno 20 g vlhké hmoty buněk *E. coli* obsahujících penicilinacylázu a směs byla homogenizována ve vodě na objem 200 ml; pH suspenze bylo upraveno na hodnotu 7,1 a vmícháno 10 ml 10% (w/v) vodného roztoku Sedipuru^R KA a suspenze ponechána flokulovat 30 minut stáním při laboratorní teplotě. Když bylo pH vyvločkové suspenze upraveno na hodnotu 7,5, byla suspenze smíchána se 16 ml 25% roztoku glutardialdehydu a umístěna na reciproký třepací stroj (200 kyvů/min); reakce probíhala 1 1/2 hodiny při teplotě 28 °C. Po přidání 100 ml vody byla zředěná směs odstředěna (500 G, 5 min), sediment promyt 250 ml vody a znovu odstředěn (5000 G, 15 min). Popsaným způsobem byla získána vlhká pasta mikrobiálních agregátů, jejichž zachycená enzymová aktivita činila 61,5 %, specifická aktivita penicilinacylázy byla 1,71 j/mg vlhké hmoty a průměrná velikost agregátů činila 550 μm. K úplné sedimentaci agregátů ve vodné suspenzi (5 g/100ml) stačilo stání v odměrném válci po dobu 10 minut.

Stejně jako v příkladu 6 byla sledována stabilita enzymové účinnosti agregátů a po 91 dnech byl zjištěn pokles aktivity penicilinacylázy v sedimentu na 77 % aktivity původní, přičemž supernatant byl čirý a měl nulovou enzymovou aktivitu.

Množství 50 ml suspenze agregátů, která obsahovala 200 mg vlhké hmoty/ml bylo použito k enzymové hydrolýze 7,5% (w/v) roztoku Na-soli benzylpenicilinu na 6-APK za podmínek uvedených v příkladu 4. Jednorázová konverze proběhla za 1 1/2 hodiny s účinností 73,9 % teoretického výtěžku 6-APK.

Příklad 17

Nepromyté odpadní mycelium dřevokazné houby *Oudemansiella mucida*, po výrobě mucidinu včetně zbytků fermentační kapaliny (kašovitá suspenze) bylo množství 300 g této suspenze smícháno se 600 ml vody, směs byla za míchání zahřáta na teplotu 60 °C a přidáno 300 ml 20% (w/v) roztoku kyseliny trichloroctové, přehřáté na teplotu 75 °C, načež byla teplota suspenze zvýšena na 80 °C a při této teplotě zahřívána ještě 13 minut. Poté byla směs ochlazená po přidavku 800 ml studené vody na teplotu 30 °C, odstředěna (5000 G, 15 min) a sediment rozmíchán ve 2 l vody na homogenní suspenzi, jejíž pH bylo upraveno na hodnotu 7,3. Odstředěním při 5000 G po dobu 30 minut bylo získáno 230 g vlhké hmoty ošetřených vláken.

K homogenní suspenzi obsahující 2,5 g vlhké hmoty této pasty a 10 g vlhké hmoty buněk *E. coli* s penicilinacyláзовou aktivitou o výsledném objemu 200 ml bylo přidáno po úpravě pH na hodnotu 7,3 8 ml 25% roztoku glutardialdehydu, načež byla směs míchána stejně jako v příkladu 16, avšak 10 hodin při teplotě 25 °C a po této době stejným způsobem zpracována.

Takto byly získány agregáty o zachycené aktivitě enzymu 35,4 % a specifické aktivitě 2,29 j/mg vlhké hmoty. Stabilita jejich enzymové aktivity byla testována stejně, jak je uvedeno v příkladu 16. Po 51 dnech se v supernatantu objevilo 21,4 % výchozí aktivity penicilinacylázy.

Příklad 18

Suspenze 10 g kašovitého odpadního mycelia *Oud. mucida*, jak je uvedeno v příkladu 17, bylo zře-

děno vodou na celkový objem 100 ml a suspenze byla desintegrována sonikací 15 minut při laboratorní teplotě (Soniprobe DAKE, Ltd., Anglie). Homogenizovaná suspenze byla zředěna 5x vodou a odstředěna (5000 G, 20 min). Získaná vlhká pasta fragmentů mycelia byla v množství 5 g smíchána s 15 g vlhké pasty buněk *E. coli* obsahujících penicilinacylázu, doplněna vodou na objem 200 ml. Po úpravě pH na hodnotu 7,7 bylo k homogenní suspenzi přidáno za míchání 20 ml 25% roztoku glutardialdehydu a dále bylo postupováno jak je uvedeno v příkladu 16 s tím rozdílem, že míchání probíhalo 3 hodiny při teplotě 19,5 °C.

Získané vlhké agregáty měly specifickou aktivitu penicilinacylázy 2,53 j/mg vlhké hmoty při zachycené aktivitě enzymu 25,5 %.

Dále byla sledována katalytická účinnost agregátů při konverzi benzylpenicilinu provedené postupem, který je uveden v příkladu 6. Za 1 1/2 hodiny bylo dosaženo 71,9 % teoretické účinnosti hydrolýzy penicilínu na 6-APK.

Příklad 19

Ve 40 g vlhké pasty buněk *E. coli* obsahujících penicilinacylázu bylo připraveno 200 ml vodné suspenze. Po úpravě pH na hodnotu 7,5 bylo do homogenní suspenze vmícháno 20 ml 10% (w/v) vodného roztoku flokulantu (Sedipur^R KA), načež probíhalo vločkování při stání suspenze při laboratorní teplotě po dobu 25 minut. pH suspenze bylo upraveno na hodnotu 7,5 a po přidání 16 ml 25% roztoku glutardialdehydu byla reakční směs míchána 3 hodiny při teplotě 26 °C na rotačním třepacím stroji (240 ot/min). Směs byla zředěna 2x vodou a odstředěna (500 G, 5 min); sediment byl promyt 350 ml vody a znovu odstředěn (5000 G, 15 min).

Získaná vlhká pasta obsahovala agregáty navzájem vázaných enzymově aktivních buněk o průměrné velikosti 400 μm. Zachycená aktivita penicilinacylázy byla 34,4 % a specifická aktivita enzymu 1,40 j/mg vlhké hmoty. Agregáty kvantitativně sedimentovaly stáním suspenze v odměrném válci (5 g/100 ml) za 10 minut.

Ze podmínek uvedených v příkladu 6 byla testována stabilita enzymové aktivity popsáním způsobem získaných agregátů. Po 40 dnech nepřetržitého míchání zůstala aktivita enzymu v sedimentu zachována, přičemž supernatant byl čirý a jeho enzymová aktivita byla nulová.

Ze podmínek uvedených v příkladu 4 byla provedena jednorázová hydrolýza 6,25 % (w/v) roztoku Na-soli benzylpenicilinu na 6-APK s výsledkem 79,1 % teoretické účinnosti za 1 hodinu.

Příklad 20

K 9,6 ml homogenní suspenze o pH 7,5 obsahující 0,5 g vlhké pasty buněk *E. coli* s penicilinacyláзовou aktivitou a 0,25 g vlhké pasty buněk *Bac. megatherium* ošetřených trichloroctovou kyselinou, jejíž příprava je popsána v příkladu 1, bylo přidáno 0,4 ml 25% roztoku glutardialdehydu. Po promíchání byla suspenze lyofilizována. Hmota, která po lyofilizaci vznikla, byla promyta vodou, mechanicky rozrušena a odstředěna 1 minutu při 1200 G.

V takto získaných agregátech o specifické aktivitě 0,4 j/mg vlhké hmoty, bylo obsaženo 14 % výchozí aktivity penicilinacylázy.

Příklad 21

K 9,2 ml homogenní vodné suspenze o pH 7,5, obsahující 3 g vlhké, částečně samovolně autolysované

pasty *E.coli* s penicilinacyláзовou aktivitou, bylo přidáno 0,8 ml 25% roztoku glutardialdehydu. Suspenze byla promíchána a přelita na Petriho misku o průměru 9,5 cm. Po 15 minutách stání za laboratorní teploty byla miska přenesena na 3 hodiny do mrazicího prostoru při teplotě -20°C a poté uložena 16 hodin při teplotě $+8^{\circ}\text{C}$. Vzniklá hmota navzájem vázaných buněk *E.coli* byla mechanicky rozrušena, promyta vodou a odstředěna 5 minut při 5000 G.

Takto připravené agregáty obsahovaly 34,5 % výchozí enzymové aktivity a jejich specifická aktivita byla 3,3 j/mg vlhké hmoty. Stabilita enzymové aktivity agregátů (4 g/100 ml vody) byla hodnocena, jak je uvedeno v příkladu 8. Po 14 dnech nebyl pozorován pokles aktivity penicilinacylázy v sedimentu; aktivita enzymu ve slabě zakaleném supernatantu činila 10 % výchozí aktivity penicilinacylázy.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Mikrobiální buněčné agregáty, obsahující buňky s vysokým množstvím enzymu penicilinacylázy k přeměně penicilínu, zejména benzylpenicilinu na kyselinu 6-aminopeniciliánovou, vyznačené tím, že sestávají z enzymově aktivních mikroorganismů chemicky vázaných prostřednictvím polyfunkčních aldehydů, s výhodou glutardialdehydu, navzájem nebo na jiné buňky různých druhů organismů, kterými jsou buď celé, neporušené, nativní anebo fyzikálně, chemicky či biochemicky ošetřené buňky či nerozpustné fragmenty prokaryontních nebo eukaryontních buněk různé morfologie.
2. Mikrobiální buněčné agregáty podle bodu 1, vyznačené tím, že celé, neporušené, nativní, anebo fyzikálně, chemicky či biochemicky ošetřené buňky či nerozpustné fragmenty prokaryontních nebo eukaryontních buněk jsou ve tvaru vláken, kulovitých, elipsoidních, popřípadě jiných útvarů o rozměrech 1,0 až 1000 μm , či buněčných fragmentů těchto buněk vzniklých samovolnou nebo uměle navozenou autolýzou, či jakýmkoliv jiným způsobem navozeným rozrušením.
3. Způsob přípravy mikrobiálních agregátů podle bodů 1 a 2, vyznačený tím, že se nechají reagovat celé neporušené, nativní, anebo fyzikálně, chemicky či biochemicky ošetřené buňky či nerozpustné fragmenty prokaryontních nebo eukaryontních buněk různé morfologie s enzymově aktivními buňkami s penicilinacyláзовou aktivitou a polyfunkčním aldehydem.
4. Způsob přípravy mikrobiálních agregátů podle bodu 3, vyznačený tím, že reakce se provádí v přítomnosti flokulačního činidla.
5. Způsob podle bodu 4, vyznačený tím, že flokulační činidlo má nejméně dvě primární anebo sekundární aminové skupiny vstupující do reakce.
6. Způsob přípravy mikrobiálních buněčných agregátů podle bodů 1 a 2, vyznačený tím, že se enzymově aktivní buňky s penicilinacyláзовou aktivitou nechají reagovat s polyfunkčním aldehydem, s výhodou glutardialdehydem v přítomnosti flokulačního činidla.
7. Způsob podle bodu 6, vyznačený tím, že flokulační činidlo má nejméně dvě primární anebo

sekundární aminoskupiny vstupující do reakce.

8. Způsob podle bodů 3 a 6, vyznačený tím, že po reakci s polyfunkčním aldehydem, s výhodou glutardialdehydem se získané agregáty promyjí organickým rozpouštědlem neinaktivujícím penicilinacylázou vybraným ze skupiny sestávající z cyclohexanu, benzenu, benzínu, toluenu, xylenu, trichlormethanu, tetrachlormethanu, trichlorethanu, dichlorethanu, chlorbenzenu, methylisobutylketonu, cyclohexanonu, butylacetátu, popřípadě jejich směsí.
9. Způsob podle bodu 3, vyznačený tím, že se používá odpadních buněk organismů nebo nerozpustných fragmentů z nich předem připravených či samovolně vzniklých.
10. Způsob přípravy mikrobiálních buněčných agregátů podle bodu 1, vyznačený tím, že se enzymově aktivní buňky s penicilinacylázovou aktivitou smísí s polyfunkčním aldehydem, s výhodou glutardialdehydem, načež se zchladí pod bod tání.
11. Způsob podle bodu 10, vyznačený tím, že se použije enzymově aktivních buněk s penicilinacylázovou aktivitou částečně autolyzovaných.
12. Způsob přípravy mikrobiálních agregátů podle bodů 3, 6 a 10, vyznačený tím, že se použije polyfunkčního aldehydu v množství 0,1 až 10 % hmotnostních.