



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

203607
(14) (B1)

(22) Přihlášeno 18 12 78
(21) (PV 8531-78)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 11/16

(40) Zveřejněno 30 06 80

(45) Vydáno 15 03 83

(75)
Autor vynálezu

VOJTÍŠEK VLADIMÍR dr. CSc.,
ZEMAN ROMAN dr.,
BÁRTA MIROSLAV dr. a
ČULÍK KAREL dr., PRAHA

(54) Způsob výroby vázaných buněk s penicilinacyláзовou aktivitou

1

Vynález se týká způsobu výroby vázaných buněk s penicilinacyláзовou aktivitou bez použití nosiče. Vázané buňky jsou použitelné k výrobě 6-aminopenicilánové kyseliny, základního meziproduktu výroby řady klinicky užívaných polosyntetických penicilinů, enzymovou hydrolýzou penicilinu, zejména benzylpenicilinu.

Běžně známé způsoby vazby buněk využívají různých ve vodě nerozpustných organických, anorganických nebo přírodních nosičů k zdokonalení sedimentačních a tím separačních vlastností buněčných preparátů. Například se využívá pro vazbu buněk sférických částic syntetických polymerů získaných cíleně vedenou polymerací na bázi methakrylaldehydu, glycidylmethakrylátu, hydroxyalkylmethakrylátu apod., které se nejprve musí předem chemicky modifikovat připojením distálních prostorových spojek s koncovými aminoskupinami a poté teprve buňky na takto modifikované polymerní částice vázat pomocí polyfunkčních činidel. Podobně postup vazby buněk podle NSR patentového spisu DOS 2 513 929 spočívá v reakci buněk s reaktivním monomerem a v následné polymeraci nebo kopolymeraci nebo s glycidylmethakrylátovým polymerem, popřípadě s kombinací s kovalentní fixací enzymu uvnitř buněk bifunkčním činidlem.

2

Nosiče těchto a podobných typů jsou nákladné přípravky, jejichž cena limituje průmyslové využití vázaných buněčných preparátů. Jistým pokrokem ve vývoji technologie vazby buněk s průmyslovým významem je způsob, jehož princip spočívá ve vazbě produkčních buněk na buněčné nosiče různých druhů organismů, kterými jsou buňky celé, neporušené a/nebo fyzikálně, chemicky nebo biochemicky ošetřené buňky nebo jejich nerozpustné fragmenty, chemicky, kovalentní vazbou, použitím polyfunkčních činidel. U tohoto způsobu vazby buněk odpadá rovněž ekonomický limit ceny nosiče, neboť používanými nosiči jsou odpadní buňky (odpadní buněčná hmota) po různých fermentačních výrobcích, jejichž cena je převážně zanedbatelná, resp. nulová. Rovněž je popsán způsob výroby produkčních buněk navzájem, tedy bez použití nosiče, avšak při popsáném způsobu vazby musí být buňky do značné míry přirozeně nebo uměle autolyzované, aby k jejich vzájemné vazbě došlo, nehledě na skutečnost, že takto připravené vázané buňky mají horší mechanické a sedimentační vlastnosti a v důsledku předchozí parciální autolýzy i nižší specifickou aktivitu. Tuto nevýhodu řeší způsob kovalentního zesílení individuálních produkčních buněk pomocí polyfunkčních činidel použitelných pro

semikontinuální výrobu 6-aminopenicilánové kyseliny. Při zmíněném způsobu se však při výrobě musí používat velkokapacitních odstředivek k separaci zesíťovaných buněk po jejich opakovaném použití, neboť rozměry jednotlivých zesíťovaných buněk jsou velmi malé (přibližně kolem 1 μm), z čehož vyplývají i jejich špatné sedimentační vlastnosti a nutnost využití vsádkové technologie výroby, vsádkového míchaného reaktoru, pro přípravu 6-aminopenicilánové kyseliny.

Zjistili jsme nyní, že čerstvé nativní buňky produkčních organismů obsahujících penicilinacylázu lze ihned po jejich separaci z fermentační kapaliny vázat bez použití nosiče a bez požadavku na jejich částečnou umělou nebo samovolnou autolýzu. Postupem podle vynálezu resultují vázané produkční buňky s vysokou specifickou aktivitou penicilinacylázy, velmi dobrými sedimentačními a především hydrodynamickými vlastnostmi. Částice vázaných buněk jsou pevné, pískovité, připomínající pryskyřici tmavohnědé až černého zbarvení, umožňující jejich využití pro kontinuální technologii výroby 6-aminopenicilánové kyseliny. Způsob a princip výroby vázaných buněk s penicilinacyláзовou aktivitou bez použití nosiče podle vynálezu se skládá z následujících technologických operací výroby:

Chemická reakce produkčních buněk v míchané vodné suspenzi s bifunkčními síťovacími činidly, čímž dojde ke kovalentnímu zesíťování-prokřížení vnitrobuněčného obsahu individuálních buněk producenta a tím k fixaci a stabilizaci penicilinacylázy obsažené v jednotlivých buňkách a dolnosti těchto buněk vůči autolýze.

Zředění suspenze buněk pro reakci vodou, jejich zahuštění na velkokapacitních odstředivkách a následná permeabilizace individuálních zesíťovaných buněk v míchané vodné suspenzi vlivem teploty, přidavku organického rozpouštědla a/nebo smáčedla, popřípadě kombinací těchto vlivů, čímž dojde k vyplavení nezreagovaných povrchových a vnitrobuněčných komponent převážně lipidického charakteru, zlepšení difúzních vlastností zesíťovaných buněk a odkrytí dalších reakce schopných skupin jejich povrchu a vnitrobuněčného prostoru.

Zředění suspenze zesíťovaných a vypraných buněk vodou po jejich permeabilizaci, jejich zahuštění na velkokapacitních odstředivkách a jejich následná chemická reakce prováděná v přítomnosti ve vodě rozpustné sloučeniny obsahující nejméně dvě primární a/ nebo sekundární aminové skupiny spolu s bifunkčními síťovacími činidly při zchlazení reakční směsi pod teplotu tání, čímž dojde k těsnému kontaktu buněk a po určité době k vytvoření navzájem vázaných, kovalentních prokřížených buněčných částic. Po vazbě buněk se zmrzlý materiál nechá samovolně rozmrazit a suspenduje za míchání

ve vodě, několikrát se dekantuje vodou a odsaje se přes textilní nebo jiný materiál.

Dobře odsátý vlhký materiál vázaných buněk se za míchání vpraví do vychlazeného acetonu nebo jeho směsi s vodou, krátkou dobu mírně míchá a dobře odsaje, čímž dojde k rychlé částečné dehydrataci vázaných buněk a k mechanickému zpevnění částic. Materiál se pak nechá botnat ve vodném prostředí, po jeho nabotnění se odsaje a popřípadě suší při přibližně 60% vlhkosti vzduchu do jeho konstantní hmoty.

Postupem podle vynálezu lze vyrobit vázané buňky s penicilinacyláзовou aktivitou bez použití nosiče s vysokou specifickou aktivitou tohoto enzymu, která činí až 90 % hodnoty specifické aktivity nativních buněk, vysokým výtěžkem zachycené enzymové aktivity, který činí až 70 % vztaheno na hmotu nativních buněk producenta pod vazbou, s vynikajícími sedimentačními a především hydrodynamickými vlastnostmi a dobrou stabilitou enzymové aktivity při dlouhodobém používání, přičemž velikost částic lze v určitém rozsahu regulovat koncentrací buněk a podmínkami reakce. Materiál se rovněž vyznačuje dobrou stabilitou na mechanický otěr vlivem míchání a tření částic a lze jej využít pro vsádkovou a zejména kontinuální technologii výroby 6-aminopenicilánové kyseliny hydrolýzou penicilinu, zejména benzylpenicilinu.

Pro enzymovou hydrolýzu využitím materiálu připraveného podle vynálezu, lze použít vodného roztoku sodné nebo draselné soli benzylpenicilinu, popřípadě surového roztoku benzylpenicilinu ve formě kyseliny, získaného při zpracování vyfermentované živné půdy po ukončené kultivaci. Získaná 6-aminopenicilánová kyselina je čistá, prostá balastních bílkovinných příměsí a polosyntetické peniciliny z ní připravené nenavozují alergické reakce v živém organismu.

Předmětem vynálezu je způsob výroby vázaných buněk s penicilinacyláзовou aktivitou bez použití nosiče k přípravě 6-aminopenicilánové kyseliny enzymovou hydrolýzou penicilinu, zejména benzylpenicilinu, vyznačující se tím, že buněčný obsah jednotlivých produkčních buněk se zesítí bifunkčními aldehydy, s výhodou glutardialdehydem, zesíťené buňky se po reakci permeabilizují účinkem teploty, přidavku organického rozpouštědla a/nebo smáčedla, popřípadě kombinací těchto vlivů, promyjí a ponechají reagovat v přítomnosti ve vodě rozpustné sloučeniny obsahující nejméně dvě primární a/nebo sekundární aminové skupiny spolu s bifunkčním aldehydem, s výhodou glutardialdehydem, při zchlazení reakční směsi pod teplotu tání a po vzniku vázaných buněčných částic se tyto promyjí, dekantují, odsají a suspendují ve zchlazeném acetonu či jeho směsi s vodou, popřípadě s jiným dehydratačním činidlem nebo jeho vodné směsí, odsají, ne-

chají bítat ve vodném prostředí a pak popřípadě odsáté suší, s výhodou při dostatečné vlhkosti vzduchu.

Předmětem vynálezu je dále způsob výroby vázaných buněk bez použití nosiče, vyznačující se tím, že namísto zchlazení reakční směsi pod bod tání se tato mírně míchá a/nebo ponechá v klidu při teplotách vyšších než 0 °C.

K způsobu výroby vázaných buněk s penicilinacylázovou aktivitou bez použití nosiče podle vynálezu lze použít v podstatě kteréhokoli producenta penicilinacylázy, u něhož je enzym lokalizován v periplasmatickém nebo vnitrobuněčném prostoru, např. druhů *Escherichia coli*, *Alcaligenes faecalis*, *Proteus rettgeri* apod. Je pochopitelně výhodné, využít pro vazbu buněk podle vynálezu mutantních organismů, získaných cíleně vedenou genetickou manipulací, které obsahují vysoké množství penicilinacylázy, neboť získané vázané buňky pak mají vysokou specifickou aktivitu enzymu. Je samozřejmé, že použitím jiného mikroorganismu (kmene) lze podle vynálezu připravit vázané buňky bez použití nosiče s odlišným kvalitativním a kvantitativním zastoupením enzymových aktivit.

Velikost vázaných buněčných částic byla posuzována mikroskopicky (optickým mikroskopem) s použitím kalibrovaného měrného okuláru při různém zvětšení. K analýze velikosti částic bylo rovněž použito kovových sít pro síťovou analýzu a vázané buněčné částice byly děleny podle velikosti použitím tří sad těchto sít, přičemž velikost otvorů těchto sít byla v rozmezí 0,03 až 2,0 milimetru.

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. Počáteční koncentrace substrátu, K nebo Na-soli benzylpenicilinu při stanovení byla 2 % (w/v). Jednotka enzymové aktivity je takové množství enzymu, které katalyzuje vznik jednoho μ molu 6-APK z benzylpenicilinu, respektive jeho solí za hodinu.

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

Příklad 1

K 25 kg vlhké buněčné pasty produkčního kmene *Escherichia coli* (specifická aktivita penicilinacylázy činila 9,0 μ mol 6-APK/hod./mg vlhké hmoty buněk) bylo přidáno 50 litrů pitné vody a pomocí vibračního míchadla 1 hodinu mícháno. Homogenní suspenze buněk byla přečerpána do nerezového míchaného kotle a pH suspenze bylo upraveno z hodnoty 5,9 na hodnotu 7,0 2 N roztokem NaOH; celkový objem suspenze činil

75 litrů. Po úpravě pH byly přidány za nepřetržitého míchání 3 litry 25% vodného roztoku glutardialdehydu a 3 hodiny mícháno při teplotě místnosti. Po této době byla reakční směs za míchání zředěna pitnou vodou na celkový objem 300 litrů a odstředěna na separátoru Sharples. Bylo získáno celkem 24 kg vlhké pasty jednotlivě zesíťovaných buněk producenta.

K 24 kg pasty zesíťovaných buněk bylo přidáno 45 litrů pitné vody a pomocí vibračního míchadla byla suspenze homogenizována po dobu 1 hodiny; objem suspenze činil 70 litrů. Homogenní suspenze zesíťovaných buněk byla přečerpána do extrakčního míchaného kotle a přidáno 7 litrů butylacetátu a intenzívně mícháno po dobu 3 hodin při teplotě místnosti. Po této době byla za míchání suspenze zředěna přidáním 33 litrů pitné vody a přidáno 2,68 litru 25% vodného roztoku Slovaflu 909. Po přidání smáčedla byla suspenze ještě po dobu 30 minut míchána, poté zředěna pitnou vodou na celkový objem 300 litrů a zesíťené buňky separovány na odstředivce Sharples. Bylo získáno celkem 22 kg zesíťovaných a částečně permeabilizovaných buněk (vlhké buněčné pasty). K 22 kg této pasty bylo předloženo 88 litrů pitné vody a pomocí vibračního míchadla byla pasta homogenizována po dobu 1 hodiny. Po této době byla homogenní suspenze přečerpána do nerezového míchaného kotle, vytemperována na teplotu 40 °C a po dobu 72 hodin při této teplotě ostře míchána.

Po této době byla suspenze zesíťovaných a permeabilizovaných buněk ochlazená na teplotu +20 °C, doplněna pitnou vodou na celkový objem 100 litrů, upraveno pH suspenze na hodnotu 7,0 2 N roztokem NaOH a za míchání přidáno 0,5 kg polyethyleniminu (Sedipur KA). Suspenze byla ještě cca 15 minut míchána a poté byly přidány 4 litry 25% vodného roztoku glutardialdehydu a míchaná reakční směs ihned rozdělena do polyethylenových sáčků po 750 ml a sáčky zataveny. Ihned po naplnění byly polyethylenové sáčky umístěny ve vodorovné poloze do předchlazených nerezových tácek a umístěny po dobu 5 hodin do mrazicího boxu při teplotě -25 °C. Po této době byly sáčky vyňaty, zmrzlý obsah v sáčcích mechanicky rozlámán na menší kousky, sáčky rozstříženy a jejich obsah postupně vsypáván do 150 litrů pitné vody, předložené v nerezovém kotli při teplotě místnosti. Po vsypání obsahu všech sáčků byly vázané buňky ponechány v předložené vodě v klidu po dobu 2 hodin. Po této době byly rozmrazené částice vázaných buněk zamíchány a čerpány na nuč s předloženou terylenovou plachtou, vakuově odsáty a 3krát dekantovány ve 120 litrech pitné vody. Po poslední dekantaci byly částice popsáním způsobem vakuově dobře odsáty a zváženy.

18 kg vlhké hmoty vázaných buněk bylo

suspendováno za míchání v předložených 50 litrech směsi aceton/voda (1:1), vychlazené předem na teplotu -20°C , a 3 minuty byla suspenze míchána. Po této době byly částice ihned ostře vakuově odsáty a na nuči ještě prosévány po dobu 30 minut, načež byly suspendovány v 50 litrech 0,05 M fosfátového pufru podle Sørensenova o pH 7,6 a ponechány botnat přes noc při teplotě $+8^{\circ}\text{C}$ a po nabotnutí opět dobře vakuově odsáty a prosávány ještě po dobu cca 30 minut. Částice byly uloženy do polyethylenového hoku, zváženy a sušeny při teplotě $+8^{\circ}\text{C}$ při vlhkosti vzduchu 57 % (40% H_2SO_4) po dobu 72 hodin.

Bylo získáno celkem 15,5 kg vlhké hmoty vázaných buněk, což je 6,2 kg suché hmoty a 62% výtěžek hmoty vztaženo na nativní buňky; vlhkost vázaného buněčného preparátu činila 60 %. Specifická aktivita penicilinacylázy vázaných buněk činila $7,8 \mu\text{molů 6-APK/h/mg}$ vlhké hmoty, což jest 86,7% výtěžek specifické enzymové aktivity, vztaženo na nativní buňky. 2,5 g vlhké hmoty vázaných buněk suspendovaných v 25 ml vody, sedimentovalo kvantitativně za 3 minuty; toto množství v uvedeném objemu zaujímalo po sedimentaci objem 8 ml. Distribuce velikosti částic se pohybovala v rozmezí 150 až $250 \mu\text{m}$ (0,15 až 0,225 mm). Materiál sestával z drobných destiček tmavohnědého zbarvení, pískovitého charakteru. Stabilita materiálu byla testována při jeho skladování při teplotě $+2$ až $+8^{\circ}\text{C}$ ve formě popsaným způsobem získané vlhké hmoty částic, uložených v polyethylenových uzavřených lahvích. V průběhu 2 měsíců za uvedených podmínek skladování nedošlo k poklesu enzymové aktivity částic vázaných buněk. Stabilita částic na mechanický otěr byla zkoumána po dobu 2 měsíců suspendováním 20 g vlhké hmoty materiálu ve 100 ml destilované vody; suspenze byla nalita do skleněných varných baněk o obsahu 500 ml, překryta hliníkovou fólií a baněk umístěny na rotační třepací stroj o počtu otáček 260/min při teplotě 30°C . Specifická aktivita částic po 2 měsících nepřetržitého třepání za uvedených podmínek činila 93,8 % aktivity výchozí při celkovém zůstatku vlhké hmoty částic 16,5 g (82,5 %).

Dále byly zkoumány hydrodynamické vlastnosti materiálu. 50 g vlhké hmoty vázaných buněk bylo naplněno do skleněného sloupce o průměru 2,6 cm s temperovaným pláštěm při teplotě 37°C . Materiálem byl čerpán 0,05 M fosfátový pufr pH 7,6 směrem zdola nahoru rychlostí 1846 ml/h. Objem materiálu ve vznosu při této průtokové rychlosti činil $220,3 \text{ cm}^3$, výška materiálu 41,5 cm. Za tohoto uspořádání bylo provedeno 5 opakovaných konverzí 0,5 litru 6,5% roztoku K-soli benzylpenicilinu na 6-APK recirkulační reakční směsí při kontinuální úpravě pH zředěnou čpavkovou vodou v skleněné míchané nádobě umístěné mimo

sloupec. Průměrná hodnota konverze činila 95,2 % za 2,5 hodiny.

Příklad 2

Zesítnění jednotlivých buněk (25 kg buněčné pasty) *E. coli* bylo provedeno podle příkladu 1. Po skončení reakce, naředění a separaci buněk byly zesítněné buňky homogenizovány ve stejném objemu, přečerpány do nerezového míchaného kotle a suspenze temperována na teplotu 40°C . Po vytemperování suspenze na uvedenou teplotu bylo k ostře míchané suspenzi, jejíž celkový objem činil 70 litrů, přidáno 7 litrů butylacetátu, 0,5 kg Slovaolu 910 a směs míchána při teplotě 40°C po dobu 10 hodin. Po této době byla suspenze zesítněných a permeabilizovaných buněk zředěna pitnou vodou na celkový objem 500 litrů a odstředěna na separátoru Sharples. Bylo získáno celkem 20 kg vlhké hmoty zesítněné a permeabilizované buněčné pasty.

Pasta byla homogenizována, přečerpána do nerezového míchaného kotle; zředěna na celkový objem 100 litrů a při teplotě 20°C přidán Sedipur KA a glutardialdehyd ve stejných koncentracích jako v příkladu 1 a dále bylo ve způsobu přípravy postupováno rovněž, jak je uvedeno v příkladu 1.

Bylo získáno celkem 17 kg vlhké hmoty vázaných buněk při výtěžku 68 % hmoty, vztaženo na nativní buňky. Specifická aktivita penicilinacylázy činila $8,0 \mu\text{molů 6-APK/h/mg}$ vlhké hmoty, což jest 88,9% výtěžek specifické enzymové aktivity, vztaženo na nativní buňky. Velikost částic se pohybovala mezi 300 až $450 \mu\text{m}$ (0,3 až 0,45 mm). Materiál sestával z destiček tmavohnědého až černého zbarvení pískovitého charakteru a za stejných podmínek, jak je uvedeno v příkladu 1, ke kvantitativní sedimentaci materiálu došlo za 2 minuty.

Příklad 3

Zesítnění a permeabilizace jednotlivých buněk *E. coli* (25 kg buněčné pasty) bylo provedeno podle příkladu 2. Bylo získáno opět 20 kg vlhké buněčné pasty. Pasta byla stejným způsobem homogenizována a zředěna na celkový objem 100 litrů v nerezovém míchaném kotli při teplotě $+20^{\circ}\text{C}$. Poté namísto Sedipuru KA bylo přidáno 0,5 kg hexamethylendiaminu a poté za jinak stejných podmínek přidán glutardialdehyd ve stejné koncentraci jako v příkladu 1 a dále postupováno za stejných podmínek, rovněž jak je uvedeno v příkladu 1.

Bylo získáno celkem 16,8 kg vlhké hmoty vázaných buněk při výtěžku 67,2 % hmoty, vztaženo na nativní buňky. Specifická aktivita penicilinacylázy činila $5,4 \mu\text{molů 6-APK/h/mg}$ vlhké hmoty, což jest 60% výtěžek specifické enzymové aktivity, vztaženo na nativní buňky.

Velikost částic se pohybovala v rozmezí 75 až 150 μm (0,075 až 0,15 mm). Materiál sestával z nepravidelných destiček červeno-hnědého zbarvení, pískovitého charakteru a za stejných podmínek, jak je uvedeno v příkladu 1, ke kvantitativní sedimentaci materiálu došlo za 4 minuty.

Příklad 4

Zesítnění jednotlivých buněk, jejich permeabilizace a vazba produkčních buněk byla provedena podle příkladu 2 s tím rozdílem, že namísto Sedipuru KA byl použit ethylendiamin v množství 0,75 kg.

Bylo získáno 13,8 kg vlhké hmoty vázaných buněk při výtěžku 55,2 % hmoty, vztaženo na nativní buňky. Specifická aktivita penicilinacylázy činila 3,9 μmol /h/mg vlhké hmoty, což jest 43,3% výtěžek specifické enzymové aktivity, vztaženo na nativní buňky. Velikost částic se pohybovala v rozmezí 50 až 150 μm (0,05 až 0,15 mm). Materiál sestával z nepravidelných destiček hnědého zbarvení, pískovitého charakteru a za stejných podmínek, jak je uvedeno v příkladu 1, ke kvantitativní sedimentaci došlo za 5 minut.

Příklad 5

Zesítnění jednotlivých buněk a jejich permeabilizace byla provedena podle příkladu 2. 20 kg vlhké hmoty zesítněné a permeabilizované buněčné pasty bylo homogenizováno v 50 litrech vody a poté přečerpáno do nerezového míchaného kotle, zředěno na celkový objem 100 litrů při teplotě v rozsahu 20 až 25 °C, úpravě pH na 7,0, a přidáno 100 g Sedipuru KA, promícháno, míchadlo zastaveno a reakční směs ponechána 30 minut v klidu, aby došlo ke kvantitativnímu vyvločkování buněk. Poté byla reakční směs pomalu míchána a k vyvločkování suspenzi přidány 4 litry 25% vodného roztoku glutardialdehydu. Reakční směs byla pomalu míchána (50 ot/min) po dobu 2 hodin při teplotě 20 °C. Po této době byla reakční směs zředěna přidáním 400 litrů pitné vody a

částice vázaných buněk odstředěny na separátoru Sharples. Separované vlhké částice byly dvakrát dekantovány pitnou vodou a posléze vakuově odsáty, jak je uvedeno v příkladu 1. Dobře odsáté částice vázaných buněk byly suspendovány ve 30 litrech čistého acetonu, vychlazeného na teplotu -25° Celsia, a 3 minuty byla suspenze míchána. Dále bylo postupováno, jak je uvedeno v příkladu 1.

Bylo získáno celkem 8,9 kg vlhké hmoty vázaných buněk, což jest 35,6% výtěžek hmoty, vztaženo na nativní buňky; specifická aktivita penicilinacylázy činila 6,1 μmol /h/mg vlhké hmoty, což jest 67% výtěžek specifické enzymové aktivity, vztaženo na nativní buňky. Velikost částic se pohybovala v rozmezí 25 až 100 μm (0,025 až 0,1 mm). Materiál sestával z nepravidelných útvarů hnědého zbarvení a za stejných podmínek, jak je uvedeno v příkladu 1, k jeho kvantitativní sedimentaci došlo za 6,5 minuty.

Příklad 6

Zesítnění jednotlivých buněk a jejich permeabilizace byly provedeny podle příkladu 2. Dále bylo postupováno podle příkladu 5 s tím rozdílem, že po přidání 100 g Sedipuru KA, zamíchání a vyvločkování suspenze, přidání glutardialdehydu a krátkodobého zamíchání probíhala reakce v klidu (bez míchání) po dobu 3 hodin. Po této době byla reakční směs mírně míchána a materiál ihned zpracován postupem uvedeným v příkladu 5.

Bylo získáno celkem 5 kg vlhké hmoty vázaných buněk při výtěžku 20 % hmoty, vztaženo na nativní buňky. Specifická aktivita penicilinacylázy činila 4,5 μmol /h/mg vlhké hmoty, což jest 50% výtěžek specifické enzymové aktivity, vztaženo na nativní buňky. Velikost částic se pohybovala v rozmezí 25 až 100 μm (0,025 až 0,1 mm). Materiál sestával z nepravidelných drobných útvarů hnědého zbarvení a za stejných podmínek, jak je uvedeno v příkladu 1, k jeho kvantitativní sedimentaci došlo za 10 minut.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby vázaných buněk s penicilinacylázovou aktivitou určených k přípravě 6-aminopenicilánové kyseliny enzymovou hydrolýzou penicilinu, zejména benzylpenicilinu, vyznačující se tím, že obsah jednotlivých buněk produkčního mikroorganismu se zesílí reakcí s bifunkčním aldehydem, s výhodou glutardialdehydem, po této reakci se zesílené buňky permeabilizují účinkem teploty, organického rozpouštědla a/nebo smáčedla, popřípadě kombinací těchto faktorů, potom se nechají reagovat ve vodném prostředí s rozpustnou sloučeninou obsahující nejméně dvě primární a/nebo sekundární aminové skupiny a s bifunkčním aldehydem, s výhodou glutardialdehydem, vzniklé vázané buněčné částice se po oddělení mechanicky zpevní za současné parciální de-

hydratace působením organických, s vodou mísitelných rozpouštědel, s výhodou acetonu nebo propanolu, popřípadě jejich směsí, za teploty 0 až -30°C , a uvádějí se do enzymově aktivní formy rehydratací ve vodném prostředí s hodnotou pH 7 až 8, s výhodou ve fosfátovém pufru.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se reakce zesílených a permeabilizovaných buněk s rozpustnou sloučeninou, obsahující nejméně dvě primární a/nebo sekundární aminové skupiny, a s bifunkčním aldehydem, s výhodou glutardialdehydem, provádí při teplotě pod bodem tání reakční směsi.

3. Způsob podle bodu 2 vyznačující se tím, že se reakce provádí při teplotě 15 až 25°C za míchání 40 až 60 ot/min nebo v klidu.