



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

209265
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 11/16

(22) Přihlášeno 23 07 79

(21) (PV 5145-79)

(40) Zveřejněno 27 02 81

(45) Vydáno 01 05 83

(75)

Autor vynálezu

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

(54) Způsob výroby stabilních preparátů vzájemně vázaných buněk prokaryontních a eukaryontních mikroorganismů s enzymovou aktivitou.

Vynález chrání obecnou metodu výroby stabilních preparátů vázaných buněk s enzymovou aktivitou, použitelných pro nejrůznější biotransformace; podstata spočívá v chemické reakci jednotlivých buněk s aldehydy, čímž resultují jednotlivé kovalentně prokřížené buňky, které se dále permeabilizují působením chemických, fyzikálně-chemických nebo fyzikálních faktorů. V dalším stupni se zesítěné a permeabilizované buňky vzájemně chemicky spojují prostřednictvím dialdehydů a diaminů, popřípadě za působení fyzikálních faktorů. K vzájemné chemické vazbě buněk není třeba žádného organického či anorganického ve vodě nerozpustného nosiče.

209265

Vynález se týká způsobu výroby stabilních preparátů vzájemně vázaných buněk prokaryontních a eukaryontních mikroorganismů s enzymatickou aktivitou, například bakterií, kvasinek a jiných imperfektních hub, použitelných pro biotransformace.

Známé způsoby vazby uvedených buněk za vzniku stabilních preparátů, lze charakterizovat jako fyzikální, fyzikálně-chemické nebo chemické, podle toho, zda je vazba buněk s nosičem nebo enzymu v buňce zprostředkována, například mechanicky při zachycení buněk v gelu, silami van der Waalsovými, polárními interakcemi nebo kovalentní vazbou. Běžně se používá různých, ve vodě nerozpustných syntetických nebo přírodních organických či anorganických nosičů, které především zlepšují hydrodynamické a sedimentační a tím i separační vlastnosti vázaných buněčných preparátů a přispívají ke stabilizaci požadované enzymové aktivity. Různé známé způsoby vazby buněk, jejich výhody a nevýhody a jejich ekonomické limity popisuje například Vandamme (Chem. Ind., No. 24, 1070, 1976) a Jack a Zajic (Adv. Biochem. Eng. 5, 126, 1977). Fyzikální způsob vazby různých enzymově aktivních buněk, a to zabudováním nativních buněk do gelu přírodního původu je popsán například v čs. patentu č. 113908, chemický způsob například v čs. autorském osvědčení č. 200802, využívající pro vazbu buněk sférických částic syntetických polymerů na bázi methakrylamidu, glycidylmethakrylátu, hydroxyalkylmethakrylátu apod., získaných cíleně vedenou polymerací. Tyto částice se nejprve musí předem chemicky modifikovat připojením distálních prostorových spojek s koncovými aminoskupinami a potom teprve lze na takto modifikované polymerní částice vázat buňky pomocí polyfunkčních činidel.

Podobně postup vazby různých enzymově aktivních buněk podle DOS 2 513 929 spočívá v reakci buněk s reaktivním monomerem a v jejich následné polymeraci nebo kopolymeraci, nebo v reakci s glycidylmethakrylátovým polymerem, popřípadě v kombinaci s kovalentní fixací enzymu uvnitř buněk bifunkčním činidlem.

Nosiče těchto a podobných typů jsou nákladné přípravy, jejichž cena a dostupnost limitují průmyslové využití vázaných buněčných preparátů. Jistým pokrokem ve vývoji technologie vazby buněk s průmyslovým významem je způsob popsáný v čs. autorském osvědčení č. 197101, jehož princip spočívá ve vazbě produkčních buněk na buněčné nosiče různých druhů organismů, kterými jsou buď celé neporušené anebo fyzikálně, chemicky či biochemicky ošetřené buňky či jejich nerozpustné fragmenty, a to chemicky, kovalentní vazbou, použitím polyfunkčních činidel. U tohoto způsobu vazby buněk odpadá ekonomický limit ceny nosiče, neboť používanými nosiči jsou odpadní buňky (odpadní buněčná hmota) po různých fermentačních výrobcích, jejichž cena je převážně zanedbatelná, resp. nulová. V uvedeném čs. autorském osvědčení je rovněž popsán způsob vazby

produkčních buněk navzájem, tedy bez použití nosiče. K tomu musí být však buňky do značné míry přirozeně nebo uměle autolýzovány, aby k jejich vzájemné vazbě došlo, nehledě k tomu, že takto připravené vázané buňky mají horší mechanické a sedimentační vlastnosti a následkem předchozí parciální autolýzy i nižší specifickou aktivitu. Tuto nevýhodu řeší způsob kovalentního zesílení individuálních produkčních buněk pomocí bifunkčních aldehydů (čs. autorské osvědčení č. 195 063. Při zmíněném způsobu se však v případě opakovaného použití musí buňky izolovat pomocí odstředivek, neboť rozměry jednotlivých zesílených buněk jsou velmi malé (přibližně kolem 1 μm), z čehož vyplývají i jejich špatné sedimentační vlastnosti, které se významně neliší od těchto vlastností u nativních buněk. Další výhodný způsob chemické vazby produkčních buněk navzájem, bez použití nosiče, je popsán v čs. autorském osvědčení č. 203 607. Tento způsob, stejně tak jako předchozí, je omezen na vazbu buněk s penicilinacylázovou aktivitou pro výrobu 6-aminopenicilanové kyseliny enzymovou hydrolyzou penicilinu.

Bylo nyní zjištěno, že základní princip, který byl popsán pro způsob výroby vázaných buněk s penicilinacylázovou aktivitou podle čs. autorského osvědčení č. 203 607 je po dalších modifikacích a zdokonaleních použitelný i pro vazbu buněk nejednodušších produkčních kmenů, resp. buněk s různými enzymovými aktivitami, bez ohledu na to, zda se jedná o bakteriálního producenta, kvasinku či jinou mikroskopickou houbu a bez ohledu na to, zda je požadovaná enzymová aktivita (požadovaný enzym) lokalizována v periplazmatickém či vnitrobuněčném prostoru (v cytoplazmě). Stejně tak v dostatečně širokém rozmezí, které je dokumentováno příklady provedení, není zásadně rozhodující kvalita enzymu, resp. typ žádané enzymově katalyzované biochemické reakce. Pro daný typ prokaryontní nebo eukaryontní buňky je v návaznosti na lokalizaci požadovaného enzymu v buňce a na kvalitě enzymu, resp. na typu enzymově katalyzované biochemické reakce a známém nebo předpokládaném chemickém složení buněčných povrchů, nutno specificky volit reakční podmínky kovalentního zesílení vnitrobuněčného obsahu jednotlivých buněk a zejména technicky a reakčních podmínek jejich permeabilizace po zesílení, stejně tak jako individuální technicky, metodických postupů a reakčních podmínek při následné vzájemné vazbě zesílených a permeabilizovaných buněk s cílem získání vázaných buněčných preparátů s dostatečně vysokými specifickými aktivitami, s dobrým výtěžkem enzymové aktivity a dalšími výhodnými vlastnostmi, zejména ve vztahu k rychlosti sedimentace a k distribuci velikosti vázaných buněčných částic, k jejich hydrodynamickým vlastnostem a k jejich mechanické a enzymové stabilitě.

Vynález se tedy týká způsobu výroby stabilních preparátů vzájemně vázaných buněk prokaryontních a eukaryontních mikroorganismů s enzymatic-

kou aktivitou, například bakterií, kvasinek a jiných imperfektních hub, použitelných pro biotransformace. Jeho podstata spočívá v tom, že se nejprve obsah jednotlivých buněk výchozího organismu zesítí reakcí s dialdehydem, s výhodou glutardialdehydem, po této reakci se zesítěné buňky permeabilizují působením fyzikálních anebo fyzikálně-chemických anebo chemických faktorů, potom se nechají reagovat ve vodném prostředí s rozpustnou sloučeninou, obsahující nejméně dvě primární anebo dvě sekundární aminové skupiny, s výhodou s polyethyleniminem nebo hexamethyldiaminem, a s dialdehydem, s výhodou s glutardialdehydem, vzniklé vzájemně vázané buňky se po oddělení promyjí vodou a popřípadě mechanicky zpevníjí přechodnou parciální dehydratací působením organických s vodou mísitelných rozpouštědel, s výhodou acetonu nebo jeho směsí s vodou, při teplotě 10 až -30°C .

Zmíněnou permeabilizaci zesítěných buněk lze provádět například mícháním buněčné suspenze ve vodném prostředí při teplotách od 0 do 70°C , při hodnotě pH 4,0 až 9,0, v přítomnosti tenzidu anebo organického s vodou mísitelného anebo nemísitelného rozpouštědla, například butylacetátu, chloroformu nebo dimethylsulfoxidu, popřípadě za současné nebo následné změny iontové síly suspenze.

Reakce zesítěných a permeabilizovaných buněk se sloučeninou rozpustnou ve vodě, obsahující nejméně dvě primární anebo dvě sekundární aminoskupiny, se účelně provádí při teplotách pod teplotou tání reakční směsi, popřípadě při teplotě 0 až 30°C , při relativní odstředivé síle 1 až 50 000 G nebo při filtračním tlaku od 0 do 50 650 kPa.

Způsobem podle vynálezu se získají stabilní preparáty vzájemně vázaných buněk s velmi dobrými sedimentačními a hydrodynamickými vlastnostmi a dobrou stabilitou požadované enzymové aktivity, přičemž velikost vázaných buněčných částic lze v určitém rozsahu regulovat koncentrací buněk, podmínkami reakce a technicko-metodickým postupem. Získaný materiál se vyznačuje rovněž dobrou stabilitou při mechanickém oteru vlivem míchání a tření částic. Lze jej principiálně využít pro různé průmyslové biotransformace, realizované jak vsádkovou, tak i semikontinuální a kontinuální technologií, podle typu reaktoru. Při volbě technologie s použitím vázaných enzymově aktivních buněk připravených ve formě stabilních preparátů způsobem podle vynálezu je třeba vycházet z typu enzymově katalyzované biochemické reakce a z reakčních podmínek. Nejvýhodnější využití preparátů podle vynálezu je v reaktorech s pevným ložem vázaných buněk. Další možnost představuje vsádková opakovaná konverze požadovaným směrem v míchaném reaktoru. Částice vzniklé ze vzájemně vázaných buněk jsou pevné, ve většině případů pískovitého charakteru, v mikroskopickém obraze patrné jako ostře ohraničené nebo neohraničené destičky, popřípadě nepravidelné morfologie. Makroskopicky připomíná tento

materiál pryskyřici světle hnědého, tmavohnědého, načervenalého nebo černého zbarvení. Tvar, velikost a zbarvení částic kolísá podle typu použitých výchozích produkčních buněk a použití techniky permeabilizace a vzájemné vazby. Výtěžek imobilizace se pohybuje v rozmezí 20 až 80 % a je závislý rovněž na dříve uvedených faktorech.

Výroba vázaných enzymově aktivních buněk podle vynálezu zahrnuje tyto operace:

1. Chemická reakce produkčních buněk v míchané vodné suspenzi s bifunkčními síťovacími činidly, čímž dojde ke kovalentnímu zesílení – prokřížení vnitrobuněčného obsahu individuálních buněk a tím k fixaci a stabilizaci požadované aktivity klíčového enzymu (enzymů), obsaženého v periplazmatickém nebo vnitrobuněčném prostoru jednotlivých buněk a ke zvýšení odolnosti těchto buněk vůči autolýze. Zásadní faktory, které ovlivňují úspěch tohoto technologického kroku, jsou koncentrace buněk, koncentrace síťovadla, reakční doba, pH suspenze, teplota reakční směsi a intenzita míchání. Tyto faktory je třeba volit individuálně.

2. Zředění suspenze buněk po reakci vodou, jejich oddělení odstředěním, promytí vodou a následná permeabilizace individuálních zesítěných buněk v míchané vodné suspenzi vlivem fyzikálních anebo fyzikálně-chemických anebo chemických faktorů, čímž se vyplaví nezreagované povrchové a vnitrobuněčné komponenty převážně lipidického charakteru,lepší difúzní vlastnosti zesítěných buněk, zejména u enzymů lokalizovaných ve vnitrobuněčném prostoru a odkryjí další reakce schopné skupiny jejich povrchu a uvnitř buněčného prostoru. Základními faktory, které ovlivňují dostatečnou permeabilizaci zesítěných buněk, jsou koncentrace buněk ve vodné suspenzi, intenzita míchání, teplota, přítomnost vhodného tenzidu a jeho koncentrace, přítomnost či nepřítomnost vhodného organického rozpouštědla a jeho koncentrace, hodnota pH a iontová síla suspenze, doba působení jednotlivých faktorů atd. Zmíněné faktory je třeba volit u každého typu buněk individuálně, a to samostatně nebo v kombinaci.

3. Zředění suspenze zesítěných a vypraných buněk po jejich permeabilizaci vodou, oddělení odstředěním, promytí vodou a následná chemická reakce v přítomnosti ve vodě rozpustné sloučeniny, obsahující nejméně dvě primární anebo sekundární aminové skupiny spolu s bifunkčními síťovacími činidly, prováděná účelně ve většině případů za takových podmínek, kdy jednotlivé buňky jsou v co nejtěsnějším vzájemném kontaktu a v minimálním pohybu. V mnoha případech je výhodné provádět vzájemnou vazbu enzymově aktivních zesítěných a permeabilizovaných buněk při ochlazení reakční směsi pod teplotu tání nebo při relativní odstředivé síle vyšší než 100 G či při filtračním tlaku vyšším než 101 kPa. Někdy, zvláště u některých enzymově aktivních eukaryontních organismů, je výhodnější reakční směs mírně míchat nebo ponechat v klidu. Za zmíněných

podmínek se po určité době vytvářejí navzájem vázané, kovalentně prokřížené buněčné částice. Základními faktory, které ovlivňují vlastnosti vázaných buněk, zejména velikost částic, požadovanou zachycenou enzymovou aktivitu, sedimentační, mechanické a hydrodynamické vlastnosti a jejich stabilitu, jako i vítězku imobilizace, jsou koncentrace buněk, koncentrace a kvalita síťovadla, koncentrace a kvalita ve vodě rozpustné sloučeniny obsahující aminové skupiny, teplota a pH reakční směsi, reakční doba a v neposlední řadě již naznačená použitá technika vedení reakce. Tyto faktory je třeba volit též individuálně.

Po vazbě buněk se získaný produkt několikrát dekantuje vodou, v případě použití techniky vazby při teplotách pod teplotou tání reakční směsi se produkt nechá samovolně rozmrazit a rovněž se několikrát dekantuje vodou a odsaje. Dobře vakuově odsátá vlhká hmota vázaných buněk se buď suší asi při 60%ní vlhkosti vzduchu při teplotě místnosti, v některých případech je výhodné odsátý materiál vpravit za míchání do vychlazeného acetonu nebo do jeho směsi s vodou, čímž dojde k mechanickému zpevnění částic jejich částečnou přechodnou dehydratací. Produkt se pak nechá botnat ve vodném prostředí, po nabotnutí se odsaje a popřípadě suší asi při 60%ní vlhkosti vzduchu do konstantní hmotnosti při teplotě místnosti. Vázané buňky lze přechovávat v dobře uzavřených skleněných nebo polyethylenových nádobách při teplotách v rozmezí 0 až 10 °C. Obsah vody ve vázaných buněčných preparátech kolísá v rozmezí 40 až 65 % hmoty. Většina preparátů za popsaných podmínek je skladovatelná po dobu několika měsíců bez ztráty původní aktivity.

Způsobem podle vynálezu lze například získávat takové stabilní preparáty, ve kterých vázané buňky obsahují enzymy například s hydrolázovou, izomerázovou, lyázovou, dekarboxylázovou, oxidoreduktázovou nebo jinou aktivitou, a to preparáty buď s jedinou aktivitou nebo s libovolnou kombinací enzymových aktivit, podle účelu použití. Vázané buňky mohou tedy obsahovat například enzym penicilinacylázu, β -galaktozidázu, L- α -amino- ϵ -kaprolaktam hydrolázu, L-asparagin amidohydrolázu, L-aspartát amoniak lyázu, glukózoizomerázu, dekarboxylázu kyseliny L-asparagové, dekarboxylázu L-lyzinu, glukózooxidázu aj.

Při způsobu výroby stabilních preparátů vzájemně vázaných buněk podle vynálezu lze používat produkčních buněk obsahujících různé enzymy, a to různých druhů a kmenů bakterií, aktinomycet, kvasinek a dalších imperfektních hub. Je pochopitelně výhodné využívat pro vazbu buněk mitantních organismů, získaných šlechtěním či cíleně vedenou genetickou manipulací, které obsahují vysoké množství požadovaného enzymu nebo enzymů, neboť získané vázané buňky pak mají vysokou specifickou enzymovou aktivitu.

Velikost vázaných buněk ve stabilních preparátech podle vynálezu byla posuzována mikroskopicky

ky (optickým mikroskopem) s použitím kalibrovaného měrného okuláru. Některé preparáty byly posuzovány rastrovacím elektronovým mikroskopem. Sedimentační vlastnosti byly hodnoceny tak, že 2,5 g vlhké hmoty preparátu bylo suspendováno v celkovém objemu 25 ml demineralizované vody v kalibrovaném odměrném válci a byl sledován čas potřebný ke kvantitativní sedimentaci částic. K analýze velikosti částic bylo rovněž použito kovových sít pro síťovou analýzu a vázané buňky byly děleny podle velikosti použitím tří sad těchto sít, přičemž síta měla otvory velikosti od 0,03 až do 2,0 mm.

V některých případech byla hodnocena i mechanická stabilita vázaných buněčných preparátů na otěr a stabilitu klíčové enzymové aktivity dlouhodobým mícháním suspenze vázaných buněk, například 5 až 10 g vlhké hmoty vázaných buněk ve 100 ml demineralizované vody bylo třepáno při teplotě 30 °C v 500 ml varných baňkách na rotačním třepacím stroji o počtu otáček 260/min. Ve zvolených časových intervalech byly odebrány vzorky suspenze a hodnocena požadovaná enzymová aktivita v sedimentu a supernatantu.

Například aktivita penicilinacylázy byla hodnocena spektrofotometricky barevnou reakcí p-dimethylaminobenzaldehydu s kyselinou 6-amino-penicilánovou, při použití draselné soli penicilinu jako substrátu, aktivita β -galaktozidázy chromatograficky s denzitometrickým vyhodnocením přírůstků koncentrace glukózy a galaktózy při použití laktózy jako substrátu. L- α -amino- ϵ -kaprolaktam hydrolázová aktivita byla hodnocena měřením úbytku L- α -amino- ϵ -kaprolaktamu jako substrátu a přírůstku produktu, L-lysinu, rovněž chromatograficky s denzitometrickým vyhodnocením. Aktivita L-asparagin amidohydrolázy byla měřena přírůstkem koncentrace amonných iontů nesslerizací kolorimetricky, při použití L-asparaginu jako substrátu. L-aspartát amoniak lyázová aktivita byla hodnocena chromatograficky s denzitometrickým vyhodnocením přírůstku koncentrací kyseliny L-asparagové při použití amonné soli kyseliny fumarové jako substrátu. Aktivity dekarboxylázy kyseliny L-asparagové a L-lysinu byly měřeny pomocí Warburgova přístroje zjišťováním rychlosti tvorby kysličníku uhličitého za použití příslušných aminokyselin jako substrátů. Aktivita glukózooxidázy byla stanovena kolorimetricky po oxidaci o-dianizidinu peroxidem vodíku prostřednictvím peroxidázy a aktivita glukózoizomerázy rovněž kolorimetricky stanovením fruktózy po reakci s cysteinem a karbazolem. V obou případech byla jako substrát použita glukóza.

Stabilní preparáty vzájemně chemicky vázaných buněk získané způsobem podle vynálezu představují významný technický i ekonomický pokrok v obou průmyslově realizovatelných biotransformacích.

Blíže podrobnosti vyplývají z příkladů provedení, které způsob podle vynálezu blíže objasňují, ale nijak neomezuji. V příkladech je rovněž uvedena enzymová aktivita nativních a vázaných buněk.

Příklad 1

Z vlhké pasty čerstvých nativních buněk *Escherichia coli* obsahujících enzym penicilinacylázu o specifické aktivitě 8 μmol 6-APK/hod/mg vlhké hmoty buněk (42 °C) pH 7,6 bylo připraveno 500 ml homogenní vodné suspenze o koncentraci buněk 0,25 g v. hm./ml; pH suspenze bylo upraveno na hodnotu 7,0 20%ním roztokem NaOH. K míchané vodné suspenzi byl přidán 25%ní vodný roztok glutardialdehydu tak, aby jeho aktuální koncentrace v reakční směsi byla 1 % (hmota/objem). Reakce probíhala 3 hodiny za nepřetržitého míchání při teplotě 20 °C. Po této době byla suspenze zředěna pitnou vodou na celkový objem 5 litrů, promíchána a buňky odstředěny (5000 G/30 minut). Bylo získáno 110 g v. hm. jednotlivě kovalentně zesítěných, promytých buněk, jejichž specifická aktivita byla 5,1 μmol 6-APK/hod/mg v. hm.

Z takto získané vlhké pasty jednotlivě zesítěných buněk byla připravena vodná suspenze o jejich koncentraci 0,25 g v. hm./ml. K homogenní míchané suspenzi jejíž pH bylo upraveno 25%ním roztokem NaOH na hodnotu 7,0 byl přidán octan butylnatý a Slovafo 909 tak, aby jejich aktuální koncentrace v suspenzi činily 2,5 obj. % v případě prvého a 0,5 obj. % v případě druhého. Suspenze byla vytemperována ve vodní lázni na 45 °C a za nepřetržitého míchání ocelovým vrtulovým míchadlem (500 ot/min) byly zesítěné buňky permeabilizovány po dobu 3 hodin. Po této době byla

suspenze ochlazená na 25 °C, zředěna pitnou vodou na celkový objem 5 litrů, promíchána a buňky odstředěny (5000 G/30 minut). Bylo získáno 78,3 g v. hm. jednotlivě zesítěných a permeabilizovaných buněk, jejichž specifická aktivita byla 6,8 μmol 6-APK/hod/mg v. hm.

Z části vlhké pasty popsaným způsobem získaných buněk bylo připraveno 150 ml homogenní vodné suspenze o pH 7,0 a koncentraci buněk 0,3 g v. hm./ml. Míchaná suspenze byla ochlazená na 10 °C a přidán Sedipur KA (polyethylenimin) tak, aby jeho koncentrace v suspenzi byla 0,5 obj. %. Poté byl k suspenzi přidán za míchání 25%ní vodný roztok glutardialdehydu tak, aby jeho koncentrace v suspenzi byla 1 % (hmota/objem) a promíchaná reakční směs byla rozplněna do 10 ml polyethylenových kyvet a v závislosti na použité relativní odstředivé síle byla prováděna tvorba navzájem vázaných buněk s penicilinacylázovou aktivitou. Reakce probíhala při 0 °C v chlazených odstředivkách Janetzki K 26 po dobu 3 hodin. Po reakci byly preparáty vázaných buněk dvakrát dekantovány vodou, vakuově odsáty přes terylenovou (mlynářskou) plachetku a ošetřeny směsí aceton : voda (1 : 1) vychlazenou na -20 °C, znovu odsáty a ponechány 16 hodin botnat ve vodě při 10 °C. Poté znovu vakuově popsaným způsobem odsáty, zváženy a hodnocena jejich rychlost sedimentace, velikost částic, jejich objem po sedimentaci a specifická aktivita způsobem, popsaným v popisu vynálezu. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Rel. odstředivá síla (G)	1100	4500	10 200	28 595	1*
Velikost částic (μm)	25—150	75—150	75—300	75—450	1—2
Rychlost sed. částic (min při 1 G)	7	5	1	1	kvant. nesed.
Objem částic po sed. (ml)	6,5	5	3	3	—
Spec. aktivita (μmol 6-APK/hod/mg v. hm. váz. buněk)	6,2	5,9	5,1	4,65	6,8
Mikroskopický obraz	neohraničené útvary s nepravidel. okraji				jednotl. buňky
Makroskopický vzhled	hnědé amorfni částice				buněčná suspenze

* Stání reakční směsi při teplotě 0 °C po dobu 3 hodin při 1 G, poté odstředění, promytí a suspendace sedimentu ve vodě.

Příklad 2

Stejná čerstvá nativní pasta buněk *Escherichia coli* s penicilinacylázovou aktivitou byla zesítěna jak je uvedeno v příkladu 1.

Permeabilizace vodné suspenze jednotlivě kovalentně zesítěných buněk byla provedena stejným způsobem pouze s tím rozdílem, že k permeabilizaci bylo namísto octanu butylnatého použito NaCl v koncentraci 5,8 g/litr (1 M koncentrace NaCl v suspenzi); koncentrace Slovafo 909, reakční doba i podmínky byly stejné jak je uvedeno v příkladu 1; pH suspenze bylo upraveno na

stejnou hodnotu až po přidání a rozpuštění NaCl.

Z vlhké pasty zesítěných, permeabilizovaných a promytých buněk o specifické aktivitě 6,1 μmol 6-APK/hod/mg v. hm. byla připravena homogenní vodná suspenze o koncentraci buněk 0,3 g v. hm./ml; pH suspenze bylo 6,9. Suspenze byla vytemperována na 40 °C a při této teplotě nepřetržitě míchána ocelovým vrtulovým míchadlem (300 ot/min) po dobu 72 hodin. Po uvedené době tepelného ošetření byla suspenze ochlazená na

209265

10 °C a doplněna na původní objem pitnou vodou.

Ke 100 ml této suspenze byl za míchání přidán Sedipur KA a glutardialdehyd jak je uvedeno v příkladu 1 a promíchaná suspenze nalita do sáčku z lněné kalolisové plachetky. Sáček byl uzavřen a umístěn ve vodorovné poloze mezi dvě kovové desky a na jeho obsah působeno filtračním tlakem $1,25 \cdot 10^4$ kPa pomocí hydraulického lisu při teplotě místnosti po dobu 30 minut.

Popsaným způsobem vznikla hnědočerná pevná hmota o celkové hmotnosti 25 g ve tvaru nepravidelné desky. Získaná hmota byla rozřezána na nepravidelné menší části a pomocí kuchyňského mixeru homogenizována ve 200 ml pitné vody přerušovaně po dobu cca 15 minut při laboratorní teplotě. Po homogenizaci byl materiál dekantován dvakrát 1 litrem vody, vakuově dobře odsát přes terylenovou plachetku a zvážen.

Bylo získáno 21 g vlhké hmoty vázaných buněk s distribucí velikosti nepravidelných částic 50 až 5000 μm ; specifická aktivita homogenátu vázaných buněk činila 3,3 μmol 6-AKP/hod/mg v. hm. a k jejich kvantitativní sedimentaci vedlo 2 minutové stání.

Příklad 3

Z vlhké zesítěné, permeabilizované a promyté pasty buněk *Escherichia coli* s penicilinacylázovou aktivitou o specifické aktivitě 4,64 μmol 6-APK/hod/mg v. hm., kdy zesítnění jednotlivých buněk bylo provedeno podle příkladu 1 a jejich permeabilizace a další tepelné ošetření po dobu 72 hodin podle příkladu 2, bylo připraveno 500 ml vodné suspenze o koncentraci buněk 0,25 g v. hm./ml. K homogenní suspenzi o teplotě 15 °C a pH 7,0 byl za míchání přidán 10%ní (hmota/objem) vodný roztok hexamethylendiaminu o pH 7,0 tak, aby jeho koncentrace v suspenzi činila 0,5 % (hmota/objem), a po 15 minutách stání byl za míchání přidán 25%ní vodný roztok glutardialdehydu tak, aby jeho koncentrace v reakční směsi byla 2 % (hmota/objem). Reakční směs byla odstředěna (10 minut/5000 G) a z takto vzniklé pasty byl zhotoven kruhový vlhký koláč o průměru 5 cm a výšce 1 cm na podložce z kalolisové lněné tkaniny. Vlhký koláč byl vsunut do sáčku z téhož materiálu a sáček uložen mezi dvě kovové desky ve vodorovné poloze a vystaven filtračnímu tlaku $1,25 \cdot 10^4$ kPa pomocí hydraulického lisu při teplotě místnosti po dobu 24 hodin. Část tmavodnědé pevné hmoty (10 g) byla rozmixována ve vodě a odsáta způsobem popsáním v příkladu 2; byly získány vázané buňky s penicilinacylázovou aktivitou s distribucí velikosti částic 100 až 1000 μm , jejichž specifická aktivita činila 2,75 μmol 6-APK/hod/mg v. hm. a k jejich kvantitativní sedimentaci vedlo 3 minutové stání.

Příklad 4

K 80 ml vodné suspenze zesítněných, permeabilizovaných a tepelně ošetřených buněk *Escherichia*

coli s penicilinacylázovou aktivitou (specifická aktivita byla 5,16 μmol 6-APK/hod/mg v. hm., koncentrace buněk v suspenzi 0,25 g v. hm./ml) o pH 7,0, která byla získána postupem uvedeným v příkladu 3, byl přidán 10%ní vodný roztok hexamethylendiaminu o pH 7,0 tak, aby jeho koncentrace v suspenzi činila 0,5 % (hmota/objem), směs byla krátce promíchána a poté ponechána v klidu stát při teplotě 11 °C po dobu 20 hodin. Poté byl za míchání k vodné suspenzi přidán 25%ní vodný roztok glutardialdehydu tak, aby jeho koncentrace v suspenzi činila 2 % (hmota/objem). Poté byla reakční směs vylita na kruhovou misku o průměru 14 cm zhotovenou z alobalu a miska uložena v horizontální poloze do mrazicího boxu; tloušťka vrstvy na misce byla cca 0,5 cm, reakce probíhala 48 hodin při teplotě -23 °C. Po této době byla miska z prazdicího boxu vyjmuta a přelita cca 100 ml pitné vody a materiál ponechán při teplotě místnosti rozmrazit. Po rozmrazení byly vázané buňky třikrát dekantovány 100 ml pitné vody, vakuově odsáty přes terylenovou plachetku a zváženy.

Bylo získáno 14,3 g v. hm. odsátých vázaných buněk. Toto množství bylo suspendováno ve 107 ml acetonu p. a., předem vychlazeného na teplotu -23 °C, po dobu 3 minut materiál ve zchlazeném acetonu míchán a poté ihned a ostře, popsáním způsobem, vakuově odsát. Vázané buňky ponechány botnat přes noc v 0,05 M fosfátovém pufru pH 7,6 při 8 °C a poté popsáním způsobem vakuově odsáty a po dobu cca 20 minut na plachetce odsávány.

Bylo získáno 14,2 g v. hm. hnědých šupinatých vázaných buněk, které stáním kvantitativně sedimentovaly za 10 minut; distribuce velikosti částic se pohybovala v rozmezí 75 až 300 μm a jejich specifická aktivita byla 4,25 μmol 6-APK/hod/mg v. hm. Materiál byl vystaven testování stability jeho enzymové aktivity a mechanické stability částic za podmínek uvedených v popisu vynálezu. Po 528 hodinách (22 dnů) nepřetržitého třepání suspenze vázaných buněk činila jejich specifická aktivita 85 % aktivity původní při zachování 70 % celkové hmoty materiálu vztaženo na hmotnost původní.

Příklad 5

20 g v. hm. (pasty) čerstvých nativních buněk *Alcaligenes faecalis* s penicilinacylázovou aktivitou bylo suspendováno v 80 ml pitné vody; pH suspenze bylo upraveno na hodnotu 7,0 20%ním roztokem NaOH. Suspenze obsahovala 0,25 g v. hm. nativních buněk/ml o specifické aktivitě 0,25 μmol 6-APK/hod/mg v. hm. (42 °C) pH 7,6.

Zesítnění jednotlivých buněk bylo provedeno podle příkladu 1. Permeabilizace zesítněných buněk podle příkladu 2. Tepelné ošetření zesítněné a permeabilizované suspenze rovněž podle příkladu 2 s tím rozdílem, že teplota míchané suspenze byla 37 °C za jinak stejných podmínek ošetření.

Ke 100 ml vodné suspenze zesítněných, permeabilizovaných a tepelně ošetřených buněk. A. faeca-

lis byl po jejich ochlazení na teplotu 10 °C za míchání přidán Sedipur KA (polyethylenimin) tak, aby jeho koncentrace v suspenzi činila 0,5 % (hmota/objem). Poté suspenze ponechána v klidu stát po dobu 30 minut a dále byl za míchání přidán 25%ní vodný roztok glutardialdehydu tak, aby jeho koncentrace v suspenzi činila 1 % (hmota/objem), suspenze krátce promíchána a dále bylo postupováno stejně, jak je uvedeno v příkladu 4 s tím rozdílem, že reakční doba během mrazení činila 5 hodin.

Bylo získáno 11,8 g v. hm. tmavěhnědých vázaných buněk, které stáním sedimentovaly kvantitativně za 4 minuty; distribuce velikosti částic se pohybovala v rozmezí 150 až 300 μm a jejich specifická aktivita činila 0,23 μmol 6-APK/hod/mg v. hm. Enzymová a mechanická stabilita částic sledovaná za podmínek uvedených v popisu vynálezu po dobu 10 dnů (240 hodin) činila za uvedenou dobu nepřetržitého třepání 100 % původní aktivity při zachování 94 % původní hmoty materiálu.

Příklad 6

250 g v. hm. čerstvé nativní pasty buněk *Escherichia coli* obsahujících enzym beta-galaktosidázu bylo suspendováno v 750 ml pitné vody; byla tak připravena homogenní suspenze buněk o pH 7,0, která obsahovala 0,33 g v. hm. nativních buněk (ml o jejich specifické aktivitě 0,035 μmol glukózy + galaktózy)/min/mg v. hm. (37 °C) pH 7,0.

Kovalentní zesítnění vnitrobuněčného obsahu jednotlivých buněk a jejich promytí bylo provedeno podle příkladu 1. Permeabilizace buněk byla provedena kombinovaným účinkem změny iontové síly, přítomnosti tenzidu a teplotou v míchané suspenzi zesítněných buněk podle příkladu 2 s tím rozdílem, že namísto Slovafolu 909 byl použit Slovafol 910 ve stejné koncentraci a teplota během 3 hodinové permeabilizace v přítomnosti 1 M NaCl byla namísto 45 °C pouze 40 °C. Bylo získáno 190 g v. hm. (pasty) zesítněných, permeabilizovaných a promytých buněk, jejichž specifická aktivita činila 0,029 μmol glukózy + galaktózy/min/mg v. hm. Pasta těchto buněk byla suspendována v pitné vodě tak, aby koncentrace buněk činila 0,3 v. hm./ml a za míchání tepelně ošetřena při 40 °C po dobu 72 hodin rovněž jak je uvedeno v příkladu 2.

Po doplnění objemu suspenze pitnou vodou na objem původní a ochlazení suspenze na 15 °C bylo při vzájemné vazbě buněk postupováno podle příkladu 5 s tím rozdílem, že reakční doba během mrazení činila 4 hodiny a že reakční směs byla po krátkém promíchání po přidání glutardialdehydu ihned rozplněna po 375 ml do polyethylenových sáčků, tyto zataveny a umístěny ve vodorovné poloze na hliníkové tácy. Způsob ošetření vázaných buněk po reakci (rozmrazení, dekantace, filtrace, ošetření acetone, botnání atd.) bylo provedeno podle příkladu 4 s tím rozdílem, že vázané buňky byly botnány přes noc v demineralizované vodě za jinak stejných podmínek.

Bylo získáno 110 g v. hm. vázaných buněk s beta-galaktosidázovou aktivitou o specifické aktivitě 0,021 μmol glukózy + galaktózy/min/mg v. hm., makroskopicky připomínající tmavěhnědou pryskyřici pískovitého charakteru, mikroskopicky se jeví jako neohrazené nepravidelné destičky s distribucí velikosti částic 75 až 300 μm . Ke kvantitativní sedimentaci částic došlo za 4 minuty. Vlhkost preparátu činila 60 %. Materiál byl vystaven testování mechanické a enzymové stability jak je uvedeno v popisu vynálezu; po 1632 hodinách (68 dnech) nepřetržitého třepání materiálu ve vodné suspenzi činila specifická aktivita vázaných buněk 110 % aktivity původní a zůstatek celkové hmotnosti materiálu po této době činil 75 % původní hmoty. 25 % hmoty materiálu vlivem obroušení a tím zmenšení částic po uvedené době třepání prošlo pláčetkou při filtraci a odsávání. Materiál vázaných buněk zůstal beze změny popsaných charakteristik včetně specifické aktivity během jeho skladování v uzavřené polyethylenové lahvi uchovávané při 10 °C po dobu 6 měsíců.

Příklad 7

Ze stejného množství vlhké hmoty čerstvých nativních buněk *Escherichia coli* s beta-galaktosidázovou aktivitou jako v příkladu 6 bylo vyrobeno 80 g vlhké hmoty vázaných buněk postupem uvedeným rovněž v příkladu 6 s tím rozdílem, že k permeabilizaci zesítněných buněk bylo použito namísto změny iontové síly (1 M NaCl) kombinovaného účinku stejné teploty a stejného tenzidu v přítomnosti 2,5 obj. % chloroformu a 1 obj. % dimethylsulfoxidu za jinak stejných podmínek reakce a manipulace.

Charakteristiky preparátu byly podobné jako v příkladu 6 s tím rozdílem, že specifická aktivita materiálu činila 0,028 μmol glukózy + galaktózy/min/mg v. hm. vázaných buněk. Stabilita materiálu za podmínek skladování uvedených v příkladu 6 se nezměnila po dobu 3 měsíců sledování.

Příklad 8

250 g v. hm. čerstvé nativní pasty buněk *Escherichia coli* obsahujících beta-galaktosidázu jako v příkladu 6 bylo ve vodné suspenzi zesítněno, permeabilizováno a tepelně ošetřeno postupem uvedeným rovněž v příkladu 6. Vzájemná vazba buněk v přítomnosti hexamethylendiaminu a ošetření vázaných buněk po vazbě byla provedena postupem uvedeným v příkladu 4.

Bylo získáno 96 g v. hm. oranžově hnědých vázaných buněk ve tvaru šupin, které stáním sedimentovaly kvantitativně za 12 minut; distribuce velikosti částic se pohybovala v rozmezí 75 až 350 μm a jejich specifická aktivita činila 0,019 μmol glukózy + galaktózy/min/mg vlhké hmoty materiálu.

Příklad 9

Z čerstvé nativní vlhké hmoty (pasty), buněk kvasinky *Kluyveromyces fragilis* obsahující enzym

beta-galaktosidázu bylo připraveno 100 ml vodné suspenze v prostředí 0,05 M fosfátového pufru pH 7,0; koncentrace nativních buněk v suspenzi činila 0,35 g v. hm. (ml a specifická aktivita těchto buněk byla 0,017 μmol glukózy + galaktózy) hod/mg v. hm. (37 °C) pH 7,0.

Kovalentní zesítnění vnitrobuněčného obsahu jednotlivých buněk včetně způsobu promytí a separace vlhké zesítněné biomasy bylo provedeno podle příkladu 1. Permeabilizace 100 ml vodné suspenze kvasinek o koncentraci buněk v suspenzi 0,25 g v. hm./ml a pH 7,0 byla provedena při teplotě 40 °C v přítomnosti 1 obj. % dimethylsulfoxidu a 0,5 obj. % toluenu v nepřítomnosti tenzidu ostrým mícháním buněčné suspenze ocelovým vrtulovým míchadlem (800 ot/min) po dobu 3 hodin. Poté byla suspenze ochlazena na teplotu místnosti a naředěna pitnou vodou na celkový objem 1 litr, krátce promíchána, buňky odstředěny (5000 G/20 minut), mléčně zakalený supernatant slit a buněčný sediment suspendován ve stejném objemu pitné vody a znovu popsáným způsobem odstředěn. Bylo získáno celkem 20 g v. hm. jednotlivě zesítněných, permeabilizovaných a promytých kvasinek, jejichž specifická aktivita činila 0,022 μmol glukózy + galaktózy/hod/mg v. hm.

20 g v. hm. popsáným způsobem ošetřených kvasinek bylo suspendováno v 380 ml pitné vody a za míchání upraveno pH homogenní suspenze buněk 20%ním roztokem NaOH na hodnotu 7,0. Poté byla suspenze přelita do 1 litrové erlenmayerovy baňky a přidán Sedipur KA (polyethylenimin) tak, aby jeho koncentrace v suspenzi činila 0,5 obj. %. Suspenze byla krátce promíchána a ponechána stát cca 15 minut. Poté byl za míchání přidán 25%ní vodný roztok glutardialdehydu tak, aby jeho koncentrace v reakční směsi činila 1 obj. %. Baňka byla umístěna na pomaloběžný reciproký třepací stroj o počtu kyvů 40/min. Reakce probíhala 3 hodiny při teplotě 29 °C za uvedených podmínek míchání. Po této době byla reakční směs zředěna pitnou vodou na celkový objem 2 litry a odstředěna (5000 G/10 minut). Sediment navzájem vázaných kvasinek byl suspendován v 1 litru pitné vody a vakuově na nuči odsát přes terylenovou plachetku a zvážen. 9,7 g v. hm. odsátého a promytého materiálu bylo za míchání suspendováno ve 100 ml acetonu vychlazeného na -20 °C, mícháno po dobu 3 minut a poté ihned částice vakuově popsáným způsobem ostře odsáty a poté ještě prosávány po dobu cca 10 minut načež byly suspendovány ve 100 ml 0,05 M fosfátového pufru pH 7,0 a ponechány přes noc botnat při teplotě 10 °C. Bylo získáno 8,1 g v. hm. navzájem vázaných kvasinek s beta-galaktosidázovou aktivitou.

Specifická aktivita materiálu činila 0,009 μmol glukózy + galaktózy/hod/mg v. hm. vázaných buněk. Distribuce velikosti částic se pohybovala v rozmezí 100 až 850 μm a k jejich kvantitativní sedimentaci vedlo 2 minutové stání. Stabilita materiálu při skladování za podmínek uvedených v příkladu 6 byla konstantní po dobu 3 měsíců.

Příklad 10

470 g v. hm. čerstvých nativních buněk kvasinky *Cryptococcus laurentii* s L-alfa-amino-epsilon-aminokaprolaktam hydrolázovou aktivitou bylo suspendováno v prostředí 0,05 M fosfátového pufru pH 7,0 na celkový objem 4,7 litru; pH homogenní suspenze bylo doupraveno 20%ním roztokem KOH na hodnotu pufru. Vznikla suspenze obsahující 0,1 g v. hm. nativních buněk/ml o specifické aktivitě 6,01 μmol L-lysinu/hod/mg v. hm. (37 °C) pH 7,5.

Kovalentní zesítnění vnitrobuněčného obsahu jednotlivých kvasinek v suspenzi bylo provedeno podle příkladu 1. Po reakci byla suspenze naředěna pitnou vodou na celkový objem 50 litrů, krátce promíchána a odstředěna na separátoru Sharples. Bylo získáno 320 g v. hm. zesítněných a promytých buněk ve formě vlhké pasty jejichž specifická aktivita činila 3,83 μmol L-lysinu/hod/mg v. hm.

320 g v. hm. zesítněných a promytých buněk bylo suspendováno na celkový objem 3,2 litru v pitné vodě a za ostrého míchání (800 ot/min) ocelovým vrtulovým míchadlem permeabilizováno v přítomnosti 1 obj. % dimethylsulfoxidu při teplotě 42,5 °C po dobu 3 hodin. Poté byla suspenze ochlazena na teplotu místnosti a zředěna na celkový objem 35 litrů pitnou vodou a odstředěna do formy vlhké buněčné pasty na separátoru Sharples. Bylo získáno 283 g v. hm. jednotlivě zesítněných, permeabilizovaných a promytých buněk kvasinek, jejichž specifická aktivita činila 4,15 μmol L-lysinu/hod/mg v. hm.

Z části vlhké hmoty popsáným způsobem získaných buněk bylo připraveno 200 ml homogenní vodné suspenze jejíž pH bylo upraveno 20%ním roztokem KOH na hodnotu 7,0; suspenze obsahovala 50 mg v. hm. buněk/ml. Suspenze byla rozdělena na dvě stejné objemové části (à 100 ml) označené A a B a do každé z nich byl za míchání přidán Sedipur KA (polyethylenimin) tak, aby jeho koncentrace v suspenzi činila 0,5 obj. %, načež z nich byly různou technikou připraveny navzájem vázané enzymově aktivní buňky způsobem jak následuje:

A. Suspenze byla za míchání ochlazena na 10 °C a ponechána stát 30 minut. Poté byl přidán za míchání 25%ní vodný roztok glutardialdehydu tak, aby jeho koncentrace v suspenzi činila 1 obj. %. Po krátkém promíchání byla vzájemná vazba buněk provedena technikou mrazení reakční směsi za podmínek uvedených v příkladu 5; způsob ošetření částic po vazbě byl proveden podle příkladu 4.

Bylo získáno 3,8 g v. hm. navzájem vázaných kvasinek s L-alfa-amino-epsilon-kaprolaktam hydrolázovou aktivitou; specifická aktivita materiálu činila 0,52 μmol L-lysinu/hod/mg v. hm. Distribuce velikosti částic se pohybovala od 75 do 1450 μm a k jejich kvantitativní sedimentaci vedlo 1 minutové stání. Mikroskopicky posuzováno tvořily částice jehlicovité ostře ohraničené útvary připomínající krystaly. Makroskopicky připomínal

materiál heterogenně krystalovaný dvojjchroman draselný včetně typického hnědočerveného zabarvení. Stabilita materiálu při skladování za podmínek uvedených v příkladu 6 byla konstantní po dobu 6 měsíců.

B. K pomalu míchané suspenzi při laboratorní teplotě byl přidán glutardialdehyd ve stejné koncentraci jako ve variantě A a dále bylo postupováno při vzájemné vazbě buněk technikou pomalého míchání reakční směsi jak je uvedeno v příkladu 9 včetně způsobu ošetření vzniklých částic po vazbě.

Bylo získáno 2,75 g v. hm. navzájem vázaných kvasinek s L-alfa-amino-epsilon-kaprolaktam hydrolázovou aktivitou; specifická aktivita materiálu činila 1,8 μmol L-lysinu/hod/mg v. hm. Distribuce velikosti částic se pohybovala v rozmezí od 15 do 900 μm a k jejich kvantitativní sedimentaci vedlo 5minutové stání. Mikroskopicky posuzováno tvořily částice nepravidelné útvary s nepravidelnými okraji. Makroskopicky materiál tvořil amorfni vatovité útvary. Stabilita materiálu při skladování za podmínek uvedených v příkladu 6 byla konstantní po dobu 6 měsíců.

Příklad 11

500 g vlhké hmoty (pasty) čerstvých nativních buněk *Alcaligenes metalcaligenes* obsahujících enzym L-aspartát amoniak lyázu bylo suspendováno v 0,05 M fosfátovém pufru na celkový objem 2 litry; vznikla homogenní suspenze o pH 7,1 obsahující 0,25 g v. hm. nativních buněk/ml. Specifická aktivita nativních buněk činila 0,75 μmol kys. L-asparagové/min/mg v. hm. (37 °C) pH 8,5.

Kovalentní zesítnění vnitrobuněčného obsahu jednotlivých buněk bylo provedeno podle příkladu 1. Permeabilizace zesítněných buněk byla provedena podle příkladu 2 s tím rozdílem, že teplota míchané suspenze během permeabilizace činila 40 °C. Tepelné ošetření buněk bylo provedeno rovněž podle příkladu 2. Vzájemná vazba buněk byla provedena technikou mrazení způsobem uvedeným v příkladu 6; způsob ošetření vázaných buněk po jejich vazbě je rovněž uveden v příkladu 6.

Bylo získáno 198 g vlhké hmoty vzájemně vázaných buněk s L-aspartát amoniak lyázovou aktivitou; specifická aktivita materiálu činila 0,5 μmol kys. L-asparagové/min/mg v. hm. Distribuce velikosti částic se pohybovala v rozmezí 75 až 300 μm a k jejich kvantitativní sedimentaci vedlo 3 minutové stání. Mikroskopicky posuzováno materiál tvořil neohraničené útvary s nepravidelnými okraji. Makroskopicky materiál tvořil světlehnědé šupiny slídivitého charakteru. Stabilita materiálu při skla-

dování za podmínek uvedených v příkladu 6 byla konstantní po dobu 1 měsíce.

Příklad 12

750 g vlhké hmoty (pasty) čerstvých nativních buněk *Corynebacterium glutamicum* obsahujících enzym aspartát amoniak lyázu bylo suspendováno v 0,05 M fosfátovém pufru na celkový objem 3 litry; homogenní suspenze obsahovala 0,25 g v. hm. nativních buněk/ml a jejich specifická aktivita byla 1 μmol kys. asparagové/min/mg v. hm. (37 °C) pH 8,5.

Kovalentní zesítnění vnitrobuněčného obsahu jednotlivých buněk bylo provedeno podle příkladu 1; jejich permeabilizace byla provedena stejně jak je uvedeno v příkladu 2 pouze s tím rozdílem, že namísto Slovafolu 909 byl použit při permeabilizaci Slovafol 910 ve stejné koncentraci za jinak stejných podmínek. Tepelné ošetření buněk bylo provedeno rovněž podle příkladu 2. Vzájemná vazba buněk byla provedena technikou mrazení reakční směsi způsobem uvedeným v příkladu 6 včetně způsobu ošetření materiálu po vazbě.

Bylo získáno 312 g v. hm. vzájemně vázaných buněk s L-aspartát amoniak lyázovou aktivitou; specifická aktivita materiálu činila 0,63 μmol kys. L-asparagové/min/mg v. hm. Distribuce velikosti částic se pohybovala v rozmezí 50 až 250 μm a k jejich kvantitativní sedimentaci vedlo 10 minutové stání. Mikroskopicky posuzováno materiál tvořil neohraničené útvary s nepravidelnými okraji. Makroskopicky materiál tvořil béžové šupiny. Stabilita materiálu při skladování za podmínek uvedených v příkladu 6 byla konstantní po dobu 3 měsíců.

Příklad 13

Z vlhké pasty čerstvých nativních buněk *Escherichia coli* obsahujících enzym aspartát amoniak lyázu o specifické aktivitě 0,35 μmol kys. L-asparagové/min/mg v. hm. nat. buněk (37 °C) pH 8,5 bylo připraveno 500 ml homogenní vodné suspenze o koncentraci buněk 0,25 g v. hm./ml; pH suspenze bylo upraveno za míchání 20%ním roztokem NaOH na hodnotu 7,0.

Kovalentní zesítnění vnitrobuněčného obsahu bylo provedeno podle příkladu 1 včetně způsobu jejich permeabilizace. Tepelné ošetření buněk po permeabilizaci bylo provedeno podle příkladu 2. 150 ml homogenní vodné suspenze obsahující 0,3 g v. hm./ml popsáním způsobem ošetřených buněk bylo použito k přípravě navzájem vázaných buněk technikou odstředování způsobem popsáním v příkladu 1 včetně způsobu jejich ošetření po vazbě. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Rel. odstředivá síla (G)	1100	4500	10 200	28 595	1*
Velikost částic (μm)	25—150	50—320	75—400	75—425	1—2
Rychlost sed. částic (min při 1 G)	12	6,5	1	1	kvant. nesed.

209265

Objem částic po sed. (ml)	10	7,5	4	4	—
Spec. aktivita (μmol kys. L-asparag./min/mg v. hm. váz. b.)	0,2	0,13	0,09	0,09	0,28
Mikroskopický obraz	neohr. útvary s nepravidel. okraji				jednotl. buňky
Makroskopický vzhled	amorfní světle hnědé částice				buněčná suspenze

* Stání reakční směsi při teplotě 0 °C po dobu 3 hodin při 1 G, poté odstředění, promytí a suspendace sedimentu ve vodě.

Příklad 14

Z vlhké pasty čerstvých nativních buněk *Mycobacterium* sp. obsahující enzym dekarboxylázu L-asparagové kyseliny o specifické aktivitě 7,1 jednotek/gram v. hm. (1 jednotka účinnosti je takové množství enzymu, které uvolní 100 μl CO_2 z kyseliny L-asparagové za 5 minut při teplotě 30 °C a pH 5,5) bylo připraveno 100 ml homogenní vodné suspenze o koncentraci nativních buněk 0,3 g v. hm./ml; pH suspenze bylo za míchání upraveno 20%ním roztokem NaOH na hodnotu 7,0.

Kovalentní zesítnění vnitrobuněčného obsahu jednotlivých buněk bylo provedeno podle příkladu 1. Permeabilizace zesítněných buněk byla provedena podle příkladu 2 s těmi rozdíly, že koncentrace zesítněných buněk v míchané suspenzi činila 0,1 g v. hm./ml, pH suspenze bylo 6,1, namísto Slovafolu 909 byl použit Slovafol 910 ve stejné koncentraci a namísto 1 M NaCl byl použit chloroform o aktuální koncentraci 5 obj. %, teplota suspenze byla 35 °C a doba trvání permeabilizace 1 hodinu. Další tepelné ošetření po permeabilizaci zesítněných buněk nebylo prováděno. Promyté, zesítněné a permeabilizované buňky byly vázány navzájem technikou mrazení postupem uvedeným v příkladu 5 s tím rozdílem, že koncentrace buněk v reakční směsi činila 0,1 g v. hm./ml. Ošetření vázaných buněk po jejich vzájemné reakci bylo provedeno podle příkladu 4.

Bylo získáno 12,1 g v. hm. vzájemně vázaných buněk s dekarboxylázovou aktivitou kyseliny L-asparagové o specifické aktivitě 0,2 j/g v. hm. materiálu. Distribuce velikosti částic se pohybovala v rozmezí 150 až 1000 μm ; částice špatně samovolně sedimentovaly, daly se však dobře filtrovat a odsávat. Makroskopicky posuzováno tvořily částice amorfní šedožluté vločky se špatně smočivým povrchem. Stabilita materiálu při skladování za podmínek uvedených v příkladu 6 byla konstantní po dobu 1 měsíce.

Příklad 15

Z vlhké pasty čerstvých nativních buněk *Bacterium cadaveris* obsahujících enzym dekarboxylázu L-lysinu o specifické aktivitě 16,4 jednotek/g v. hm. (1 jednotka účinnosti je takové množství enzymu, které uvolní 100 μl CO_2 z L-lysinu při teplotě 30 °C a pH 5,5) bylo připraveno 100 ml homogenní vodné suspenze o pH 7,0 a koncentraci nativních buněk 0,25 g v. hm./ml.

Kovalentní zesítnění vnitrobuněčného obsahu jednotlivých buněk bylo provedeno podle příkladu 1. Permeabilizace zesítněných buněk podle příkladu 2 s těmi rozdíly, že koncentrace buněk v permeabilizované suspenzi činila 0,1 g v. hm./ml, pH suspenze bylo 6,3 a namísto Slovafolu 909 byl použit Slovafol 910 o stejné koncentraci, přičemž teplota během permeabilizace byla 35 °C. Dále bylo postupováno podle odkazu uvedeného v předchozím příkladu (příklad 14).

Bylo získáno 9,35 g v. hm. vzájemně vázaných buněk s dekarboxylázovou aktivitou L-lysinu o specifické aktivitě 0,67 j/g v. hm. materiálu. Distribuce velikosti částic se pohybovala v rozmezí 75 až 300 μm a k jejich kvantitativní sedimentaci vedlo 4 minutové stání. Mikroskopicky posuzováno byly částice tvořeny šupinatými destičkami s nepravidelnými okraji. Makroskopicky posuzováno připomínaly částice jemnou pryskyřici světle hnědého zbarvení. Stabilita materiálu při skladování za podmínek uvedených v příkladu 6 byla konstantní po dobu 1 měsíce sledování v jednotných intervalech.

Příklad 16

300 g vlhké hmoty (pasty) čerstvých nativních buněk *Escherichia coli* obsahujících enzym L-asparagin amidohydrolázu bylo suspendováno v pitné vodě na celkový objem 1 litr. Homogenní suspenze obsahovala 0,3 g v. hm. nativních buněk/ml a jejich specifická aktivita byla 0,09 μmol kys. L-asparagové/min/mg v. hm. (37 °C) pH 5,0.

Kovalentní zesítnění vnitrobuněčného obsahu jednotlivých buněk bylo provedeno podle příkladu 1 a bylo získáno 394 g vlhké hmoty zesítněných, promytých buněk o specifické aktivitě 0,015 μmol kys. L-asparagové/min/mg v. hm. Permeabilizace suspenze obsahující 0,25 g v. hm. zesítněných buněk/ml byla provedena v přítomnosti pouze 1 M NaCl, pH suspenze bylo 6,0 a suspenze byla třepána v 500 ml varných baňkách se třemi vlny (zarážkami) na rotačním třepacím stroji o počtu otáček 260/min při teplotě 30 °C po dobu 3 hodin. Po permeabilizaci byly buňky promyty zředěním pitnou vodou na desetinásobek objemu suspenze a odstředěny (5000 G/30 minut). Z 250 g v. hm. zesítněných buněk bylo získáno 181,5 g v. hm. zesítněných, permeabilizovaných a promytých buněk o specifické aktivitě 0,029 μmol kys. L-asparagové/min/mg v. hm. Tepelné ošetření buněk po permeabilizaci bylo provedeno podle příkladu 2,

vzájemná vazba buněk technikou mrazení podle příkladu 6 a ošetření buněk po vzájemné vazbě podle příkladu 4.

Bylo získáno 102 g v. hm. vzájemně vázaných buněk s L-asparagin amidohydrolázovou aktivitou; specifická aktivita materiálu byla 0,039 μmol kys. L-asparagové/min/mg. Distribuce velikosti částic se pohybovala v rozmezí 75 až 750 μm a k jejich kvantitativní sedimentaci vedlo stání 8 minut. Mikroskopicky posuzováno tvořil materiál neohraničené útvary s nepravidelnými okraji. Makroskopicky tvořil materiál šupiny světle hnědé barvy. Stabilita materiálu při skladování za podmínek uvedených v příkladu 6 byla konstantní po dobu 3 měsíců.

Příklad 17

150 g vlhké hmoty (pasty) čerstvých nativních buněk *Erwinia aeroides* obsahujících enzym L-asparagin amidohydrolázu bylo suspendováno v pitné vodě na celkový objem 500 ml; homogenní suspenze obsahovala 0,3 g v. hm. nativních buněk/ml o specifické aktivitě 0,15 μmol kys. L-asparagové/min/mg v. hm. (37 °C) pH 5,0. pH suspenze bylo upraveno 20% ním roztokem NaOH na hodnotu 7,0.

Dále bylo postupováno podle příkladu 16; bylo získáno 100 g v. hm. zesíťovaných, permeabilizovaných a tepelně ošetřených buněk, jejichž specifická aktivita byla 0,12 μmol kys. L-asparagové/min/mg v. hm. Při vzájemné vazbě buněk technikou filtračního tlaku bylo dále postupováno podle příkladu 2 s tím rozdílem, že reakční doba činila 2 hodiny.

Popsaným způsobem vznikla pevná hnědá hmota o celkové hmotnosti 75 g ve tvaru nepravidelné desky. Získaná hmota byla rozřezána na nepravidelné menší kousky a pomocí masového stroju rozemleta; vznikl křehký granulovaný materiál, který byl suspendován v 250 mg acetonu vychlazeného na -20 °C a po dobu 3 minut intenzivně míchán. Poté byl materiál ihned ostře vakuově odsát přes terylenovou plachetku a na plachetce ještě cca 20 minut odsáván. Poté byl suspendován ve 250 ml demineralizované vody a ponechán přes noc botnat při 10 °C. Poté byl materiál dobře odsát a zvážen.

Bylo získáno 63 g v. hm. navzájem vázaných buněk s L-asparagin amidohydrolázovou aktivitou o specifické aktivitě 0,05 μmol kys. L-asparagové/min/mg v. hm. Distribuce velikosti částic se pohybovala v rozmezí hodnot 550 až 1650 μm a k jejich kvantitativní sedimentaci vedlo 1 minutové stání. Makroskopicky posuzováno tvořily částice hnědé amorfni granule. Stabilita materiálu při skladování za podmínek uvedených v příkladu 6 byla konstantní po dobu 6 měsíců.

Příklad 18

150 g vlhké hmoty čerstvých nativních buněk *Aspergillus niger* obsahujících enzym glukózooxidázu o specifické aktivitě 0,105 μmol H_2O_2 /min/mg v. hm. nativních buněk bylo suspendováno

v 1 litru pitné vody; suspenze obsahovala 0,15 g v. hm./ml., pH suspenze bylo za míchání upraveno 20% ním roztokem NaOH na hodnotu 7,0.

Kovalentní zesíťování vnitrobuněčného obsahu jednotlivých buněk bylo provedeno podle příkladu 1 a bylo získáno 125 g v. hm. zesíťovaných buněk o specifické aktivitě 0,08 μmol H_2O_2 /min/mg v. hm. Permeabilizace zesíťovaných a promytých buněk byla prováděna ve vodné suspenzi obsahující 0,05 g v. hm. zesíťovaných buněk/ml v baňkách se třemi vlny postupem uvedeným v příkladu 16. Bylo získáno 107 g v. hm. zesíťovaných a permeabilizovaných buněk o specifické aktivitě 0,1 μmol H_2O_2 /min/mg v. hm. Tepelné ošetření buněk po permeabilizaci nebylo prováděno. Vzájemná vazba buněk byla provedena technikou mrazení podle příkladu 6 s tím rozdílem, že koncentrace zesíťovaných a permeabilizovaných buněk v reakční směsi byla 0,08 g v. hm./ml. Ošetření materiálu po vazbě bylo provedeno rovněž podle příkladu 6.

Bylo získáno 62 g vlhké hmoty vzájemně vázaných buněk s glukózooxidázovou aktivitou; specifická aktivita materiálu činila 0,095 μmol H_2O_2 /min/mg v. hm. Distribuce velikosti částic se pohybovala v rozmezí hodnot 100 až 1000 μm a k jejich kvantitativní sedimentaci vedlo 12 minutové stání. Makroskopicky posuzováno tvořil materiál tmavě šedé amorfni pelety. Stabilita materiálu při skladování za podmínek uvedených v příkladu 6 byla konstantní po dobu 3 měsíců. Materiál byl vystaven testování mechanické a enzymové stability postupem uvedeným v příkladu 6 za podmínek uvedených v popisu vynálezu; po 288 hodinách (12 dní) nepřetržitého třepání vodné suspenze vázaných buněk činila specifická aktivita 70 % aktivity původní.

Příklad 19

150 g vlhké hmoty (pasty) čerstvých nativních buněk *Streptomyces phaeochromogenes* s glukózoizomerázovou aktivitou bylo suspendováno v 1 litru 0,05 M fosfátového pufru pH 7,0. Koncentrace nativních buněk v homogenní suspenzi činila 0,15 g v. hm./ml a jejich specifická aktivita byla 0,021 μmol fruktózy/min/mg v. hm. (60 °C) pH 6,85.

Kovalentní zesíťování vnitrobuněčného obsahu jednotlivých buněk včetně způsobu jejich separace a promytí bylo provedeno podle příkladu 1. Bylo získáno 119 g v. hm. zesíťovaných a promytých buněk o specifické aktivitě 0,012 μmol fruktózy/min/mg v. hm. Permeabilizace zesíťovaných buněk byla provedena podle příkladu 6 s tím rozdílem, že koncentrace zesíťovaných buněk v suspenzi činila 0,08 g v. hm./ml a teplota suspenze během 3hodinové permeabilizace činila 60 °C. Další tepelné ošetření zesíťovaných buněk po jejich permeabilizaci nebylo prováděno. Vzájemná vazba buněk byla provedena technikou mrazení postupem uvedeným v příkladu 5 s tím rozdílem, že koncentrace buněk v reakční směsi činila 0,12 g v. hm./ml. Ošetření materiálu po vazbě bylo provedeno rovněž podle příkladu 5.

Bylo získáno 71 g vzájemně vázaných buněk s glukózoizomerázovou aktivitou; specifická aktivita materiálu činila 0,01 μmol fruktózy/min/mg v. hm. Distribuce velikosti částic se pohybovala v rozmezí hodnot 200 až 1300 μm a k jejich kvantitativní sedimentaci vedlo 4minutové stání. Mikroskopicky posuzováno tvořily částice nepravidelné destičky s ohraničenými okraji. Makroskopicky tvořil materiál světle hnědé šupiny. Stabilita materiálu při skladování za podmínek uvedených v příkladu 6 byla konstantní po dobu 6 měsíců.

Příklad 20

Nativní buňky *E. coli* o specifické aktivitě penicilinacylázy 7,0 μmol 6-APK/hod./mg vlhké hmoty byly zesítěny a permeabilizovány jak je uvedeno v příkladu 1 s tím rozdílem, že zesítěné buňky měly aktivitu 5,8 μmol 6-APK/hod./mg vlhké hmoty a že permeabilizace byla prováděna se suspenzí zesítěných buněk 0,5 g vlhké hmoty/ml při koncentracích butylacetátu 5 % objem/objem a Slovaolu 909 1 % objem/objem v průběhu 4hodinového nepřetržitého míchání při 25 °C (500 ot./min.), takže specifická aktivita permeabilizovaných buněk činila 8,0 μmol 6-APK/hod./mg vlhké hmoty.

Z popsaným způsobem permeabilizovaných buněk byla připravena vodná suspenze 50 g/100 ml, jejíž pH bylo upraveno na hodnotu 7,6. Poté bylo k suspenzi přidáno 5 ml 10%ního vodného roztoku Sedipuru CL-930 a po 5 minutách stání 4 ml 25%ního vodného roztoku glutardialdehydu. Směs byla intenzivně promíchána, naplněna do injekční stříkačky opatřené jehlou o vnitřním průměru 1,6 mm a vytlačována na hliníkový táč do formy válcovitých dlouhých útvarů. Po 2hodinovém sušení na vzduchu při teplotě místnosti byly asi 2/3 materiálu 3× dekantovány vodou a pak ještě 30 minut bobtnány ve vodě, aby se vyplavily nezreagované složky, a asi polovina tohoto množství byla po odsátí ponechána schnout na vzduchu při teplotě místnosti 24 hodin, načež byl materiál 24 hodin bobtnán ve vodě a pak odsát, (varianta a). Druhá polovina materiálu po 30minutovém bobtnání a obsátí byla intenzivně míchána 5 minut s vychlazeným acetonem, jehož teplota byla -27 °C, poté odsáta, bobtnána 24 hodin ve vodě a znovu vakuově odsáta, (varianta b). Zbylá 1/3 materiálu po počátečním 2hodinovém sušení byla dále sušena celkem 24 hodin, tedy v přítomnosti nezreagovaných reakčních složek (glutaraldehyd, Sedipur). Nato byl preparát 5× dekantován vodou, bobtnán 24 hodin ve vodě a odsát, (varianta c).

Tmavohnědé odsáté materiály byly mechanicky upraveny do konečné formy krátkých válečků o průměru 1 mm. Specifické aktivity penicilinacylázy u jednotlivých preparátů vykazovaly tyto hodnoty v μmol 6-APK/hod./mg vlhké hmoty:

- (a) 0,80 (sušení bez reagentů)
- (b) 0,75 (sušení acetonem)
- (c) 0,60 (sušení s reagenty).

Příklad 21

Byla použita vlhká pasta zesítěných a permeabilizovaných buněk s penicilinacyláзовou aktivitou 8,0 μmol 6-APK/hod./mg vlhké hmoty získaná podle příkladu 20. Z této buněčné pasty byla připravena suspenze 10 g/20 ml pomocí 51,4%ního vodného roztoku Sedipuru CL-930 ostrým mícháním. Z této suspenze byla odstředěním (10 000 G/20 minut) připravena řídká pasta, která byla pomocí injekční stříkačky bez jehly o vnitřním průměru 2 mm vytlačována do 10%ního roztoku glutardialdehydu. Proces byl doprovázen vznikem kapek, které setrvaly chvíli na hladině vodného roztoku glutardialdehydu a pak dopadaly na podstavené síto ve formě granulí. Granule byly ponechány mořit v roztoku glutardialdehydu při laboratorní teplotě 30 minut a potom byly na sítku promývány 1 hodinu pomalým prouděním vody. Odsáté granule, které byly ještě měkké, byly sušeny 24 hodin volně na vzduchu při teplotě místnosti. Po 48hodinovém bobtnání ve vodě byly tmavohnědé granule odsáty do konečné formy preparátu, jehož penicilinacyláзовá aktivita činila 1,25 μmol 6-APK/hod./mg vlhké hmoty.

Příklad 22

600 g vlhké hmoty buněk *Alcaligenes metalcaligenes* obsahující asparát amoniak lyázu o specifické aktivitě 0,45 μmol kyseliny L-asparagové/min./mg vlhké hmoty (pH 8,5, 37 °C), bylo suspendováno v pitné vodě na celkový objem 2 litry. Takto vzniklá suspenze buněk o pH 7,5 byla sítěna mícháním v přítomnosti 0,5%ního glutardialdehydu (hmota/objem) po dobu 1 hodiny při teplotě 25 °C. Poté byla reakční směs zředěna 10× vodou a buňky byly odděleny odstředěním. Pasta zesítěných buněk byla suspendována v 1,5 M vodném roztoku fumaranu amonného obsahujícím 1 mg/ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ o pH 8,5 na koncentraci 300 g vlhké hmoty buněk/1 t a po přidání Slovaolu 909 tak, aby jeho koncentrace v suspensi činila 0,1% byla suspenze míchána 48 hodin při 30 °C. Poté byla suspenze odstředěna (6.000 G/30 min.) a po promytí 2 × 3 l vody bylo získáno 416 g vlhké hmoty buněk o specifické aktivitě 0,35 μmol kys. L-asparagové/mg vlhké hmoty.

10 g vlhké pasty zesítěných, permeabilizovaných a aktivovaných buněk s aspartázovou aktivitou bylo suspendováno v 3%ním (hmota/objem) roztoku Sedipuru CL-930 na celkovou koncentraci 0,2 g buněk/ml. Při pH 7,0 byla suspenze ponechána stát 30 minut a poté byla odstředěna (6000 g/30 minut). Získaná pasta byla vytlačena otvorem o průměru 1,6 mm do 0,5%ního vodného roztoku glutardialdehydu pH 7,0, kde byla ponechána 15 minut při teplotě místnosti. Poté byl získaný materiál promyt 2 × 50 ml vody a sušen na vzduchu při teplotě místnosti po dobu 18 hodin. Usušený materiál byl mechanicky rozdrcen na částice válcovitého tvaru o délce 1–3 mm. Po 16hodinovém bobtnání v 1,5 M vodném roztoku fumaranu amonného obsahujícího hořečnaté ionty

při 29 °C bylo získáno 3,8 g pevných rychle sedimentujících částic s dobrými hydrodynamickými

vlastnostmi o aktivitě 0,05 μmol kyseliny L-asparagové/min./mg vlnké hmoty materiálů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby stabilních preparátů vzájemně vázaných buněk prokaryontních a eukaryontních mikroorganismů s enzymatickou aktivitou, zejména bakterií, kvasinek a jiných imperfektních hub, použitelných pro biotransformace, vyznačující se tím, že se nejprve obsah jednotlivých buněk výchozího organismu zesílí reakcí s dialdehydem, s výhodou glutardialdehydem, po této reakci se zesílené buňky permeabilizují působením fyzikálních anebo fyzikálně-chemických anebo chemických faktorů, potom se nechají reagovat ve vodném prostředí s rozpustnou sloučeninou, obsahující nejméně dvě primární anebo dvě sekundární aminové skupiny, s výhodou s polyethyleminem nebo hexamethyldiaminem, a s dialdehydem, s výhodou s glutardialdehydem, vzniklé vzájemně vázané buňky se po oddělení promyjí vodou a popřípadě mechanicky zpevníjí přechodnou parciální dehydratací působením organických s vodou mísitelných rozpouštědel, s výhodou acetonu

nebo jeho směsí s vodou, při teplotě 10 až -30 °C.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se permeabilizace zesílených buněk provádí mícháním buněčné suspenze ve vodném prostředí při teplotách od 0 do 70 °C, při hodnotě pH 4,0 až 9,0, v přítomnosti tenzidu anebo organického s vodou mísitelného anebo nemísitelného rozpouštědla, zejména butylacetátu, chloroformu nebo dimethylsulfoxidu, popřípadě za současné nebo následné změny iontové síly suspenze.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se reakce zesílených a permeabilizovaných buněk se sloučeninou rozpustnou ve vodě, obsahující nejméně dvě primární anebo dvě sekundární aminoskupiny a s dialdehydem provádí při teplotách pod teplotou tání reakční směsi.

4. Způsob podle bodu 3, vyznačující se tím, že se reakce provádí při teplotě 0 až 30 °C, při relativní odstředivé síle 1 až 50 000 G nebo při filtračním tlaku od 0 do 50 650 kPa.