



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU

## K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

234 059

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita  
(22) Přihlášeno 22 12 82  
(21) (PV 9573-82)

(51) Int. Cl.<sup>3</sup> C 12 N 11/08

(40) Zveřejněno 13 08 84  
(45) Vydáno 01 10 86

(75)  
Autor vynálezu

VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc., PRAHA,  
ČEJKOVÁ ALENA ing. CSc., BEROUN,  
BÁRTA MIROSLAV RNDr.,  
JIRKŮ VLADIMÍR RNDr. CSc.,  
VERUOVIČ BUDIMÍR ing. CSc.

KRUMPHANZL VLADIMÍR prof. ing. DrSc., PRAHA,  
KUBÁNEK VLADIMÍR doc.ing.CSc., KRALUPY NAD  
VLTAVOU  
KRÁLÍČEK JAROSLAV prof. ing. DrSc.,  
VANĚK TOMÁŠ RNDr.,  
MACEK TOMÁŠ ing. CSc., PRAHA

(54) Způsob imobilizace mikrobiálních buněk, rostlinných buněk a enzymů

234 058

Vynález se týká způsobu imobilizace mikrobiálních buněk, rostlinných buněk a enzymů na aktivované organické a anorganické polymery za tvorby imobilizovaných buněčných nebo enzymových biokatalyzátorů.

Buněčné nebo enzymové biokatalyzátory podle vynálezu jsou využitelné pro průmyslové biotransformace resp. umožňují vypracovat diskontinuální nebo kontinuální biotechnologie výroby farmaceuticky, potravinářsky či zemědělsky významných produktů či mezi-produktů.

Znamé způsoby imobilizace buněk a enzymů lze obecně charakterizovat jako fyzikální např. sorpce a inkluze, fyzikálně chemické např. polární vazba a chemické např. kovalentní vazba. Podrobněji jsou tyto postupy zmíněny pokud jde o imobilizaci buněk např. v přehledných člancích Vandamme /Chem. Ind., 1070, 1976/, Jack a Zajic /Adv. Biochem. Eng., 5, 126, 1977/, Durand a Navarro /Proc. Biochem., 13, 14, 1978/, Vojtíšek a sp. /Biol. listy, 44, 192, 1979/ a Chibata a Tosa /Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10, 197, 1981/, pokud jde o imobilizaci enzymů např. v monografiích Immobilized Enzymes /edit. O. Zaborsky, CRC Press, A Division of the Chemical Rubber Co., USA Cleveland, Ohio, 1974/, Insolubilized Enzymes /edit. M. Salmona, C. Saroni, S. Gerattini, Raven Press, New York, 1974/ a Industrial Enzymes, Recent Advances /J. C. Johnson, Noyes Data Corporation, Park Ridge, New Jersey, Chemical Technology Review No 85, USA, 1977/.

Jako nosičů pro imobilizaci buněk a enzymů je využívána řada syntetických organických inertních či chemicky aktivních polymerů získaných cíleně vedenou polymerací např. na bázi methakrylaldehydu, glycidylmethakrylátu, hydroxyalkylmethakrylátu, přírodních

organických polymerů např. celulózy a jejích derivátů, chitinu, polysacharidů, anorganických přírodních nebo umělých materiálů, např. drti z cihel, písku, porézní hlíny, jílu, keramických materiálů, skla, anorganických gelů na bázi zirkonia a titanu apod.

Z řady jmenovaných, různých, více či méně chemicky definovaných materiálů, které lze využít jako nerozpustných nosičů pro imobilizaci buněk a enzymů vyplývá, že tyto materiály se budou lišit především cenou a dostupností a jejich využití pro imobilizaci bude limitováno především teritoriálními podmínkami, zvláště u syntetických, chemicky definovaných organických a anorganických polymerů. Tak např. byl popsán způsob imobilizace bakteriálních buněk na povrch modifikovaných makroporézních kopolymerů čs. provenience, zejména glycidylmethakrylátu s ethyléndimethakrylátem a kopolymerů methakrylaldehydu s divinylbenzenem po jejich převodu na aminoderiváty ošetřením organickými aminy a zesíťtím glutaraldehydem v čs. autorském osvědčení č. 200 802, dále způsob imobilizace kvasinek na částice organického polymeru čs. provenience na bázi hydroxyalkylmethakrylátu, po předchozí chemické aktivaci částic nosiče epichlorhydrinem, modifikaci hexamethylen-diaminem a následné kovalentní vazbě buněk glutaraldehydem v čs. autorském osvědčení č. 201 786. I když byly získány preparáty imobilizovaných buněk s dobrými biochemickými a dalšími vlastnostmi, cena a dostupnost a možné způsoby chemické aktivace a modifikace zmíněných typů organických polymerů nedovolují reálný předpoklad průmyslového využití těchto materiálů jako nosičů požadovaných biologických aktivit pro průmyslové biotransformace. Z ekonomicky přitažlivého hlediska se zdají být nejvíce využitelné organické a anorganické umělé nebo přírodní materiály typu různých sorbentů, jejichž cena a dostupnost významně neovlivňuje jejich průmyslové využití.

V Československu byly vyvinuty, a některé z nich jsou průmyslově vyráběny, různé syntetické organické a anorganické polymerní sorbenty. Jedná se o polymerní mikroporézní organický sorbent na bázi polyethylentereftalátu /SORSILEN/, jehož způsob výroby je uveden v čs. autorském osvědčení č. 171 917 a polymerní mikroporézní organické sorbenty na bázi poly/-2,6-dimethyl/fenyloxiidu

/SORFIX/, na bázi poly-6-kaprolaktamu /APA a SILONA lišící se stupněm polymerace/, na bázi kopolymeru poly-6-kaprolaktamu s polyethylenoxidem /AMIDAP/ a na bázi blokového kopolymeru vinylchloridu s vinylacetátem, jejichž způsoby výroby jsou uvedeny v čs. autorském osvědčení č. 202 215. Z dalších organických sorbentů čs. provenience lze uvést polykondenzáty melaminu a formaldehydu /MP/ a močoviny a formaldehydu /MOF/, jejichž způsob výroby je předmětem čs. autorského osvědčení č. 203 386. Konečně je v Československu průmyslově vyráběn anorganický mikroporézní sorbent na bázi polymerního oxidu křemičitého pod komerčním označením SILOXID. Všechny uvedené typy polymerních organických a anorganických sorbentů lze principiálně připravit v požadované kvalitě, zejména o požadované distribuci velikosti částic, specifickém povrchu, porositě, bobtnavosti apod., což umožňuje využití těchto materiálů jak pro imobilizaci celých buněk tak enzymů.

Limitujícím faktorem universálního využití těchto polymerních sorbentů čs. provenience, jako nosičů pro imobilizaci biologicky aktivních materiálů, je však universální způsob imobilizace celých enzymově aktivních buněk a enzymů, s cílem dosažení vysoké specifické aktivity získaných imobilizovaných katalyzátorů a vysokého výtěžku imobilizace při zachování vysoké stability biologických resp. enzymových funkcí, bez ohledu na chemické složení těchto polymerních sorbentů na jedné straně, organický a anorganický sorbent, základní chemické složení monomeru, typ chemických vazeb a stupeň polymerace, a druhu a kvality výchozího biologicky resp. enzymově aktivního materiálu, který je imobilizován, mikrobiální buňky, rostlinné buňky, enzymy mikrobiálního, živočišného či rostlinného původu, na straně druhé.

V československé patentové literatuře byly již popsány určité způsoby imobilizace především enzymů na některé z uvedených typů polymerních mikroporézních sorbentů čs. provenience. Jedná se především o čs. autorské osvědčení č. 214 096, kde je popsáno využití mikroporézních částic polymerů na bázi polyethyltereftalátu /SORSILEN/, polydimethylfenyloxydu /SORFIX/ a polykaprolaktamu /APA/ pro výrobu imobilizovaných enzymů jejich sorpcí a ná-

sledné kovalentní vazby pomocí sorbovaných síťovacích činidel, zejména glutaraldehydu, toluendiisokyanátu, divinylsulfonu apod., nebo sorpcí roztoků enzymů na částice těchto organických polymerních sorbentů a následujícího kovalentního zesíťení sorbovaných enzymů těmito polyfunkčními síťovacími činidly. Citované autorské osvědčení zahrnuje pouze využití uvedených tří typů mikroporézních organických polymerních sorbentů a je omezeno pouze na způsob výroby imobilizovaných enzymů popsaným způsobem. V čs. autorském osvědčení č. 209 743 je popsán opět pouze způsob imobilizace enzymů s omezením na mikroporézní organické polymerní sorbenty čs. provenience na bázi poly-6-kaprolaktamu, lišících se různým stupněm polymerace a polykondenzátů melaminu s formaldehydem a močoviny s formaldehydem, tedy výhradně organických polymerních sorbentů, obsahujících v molekule polymeru primární nebo sekundární aminoskupiny, přičemž vlastní imobilizace enzymů spočívá v předchozí chemické reakci částic těchto syntetických aminopolymerů s volným glutaraldehydem, za současné chemické aktivace těchto polymerních částic, vymytí nadbytku glutaraldehydu a následující kovalentní vazby enzymů prostřednictvím chemicky aktivních aldehydových skupin, za tvorby Schiffových bazí mezi enzymovou bílkovinou a částicemi uvedených, popsaným způsobem aktivovaných, sorbentů. Konečně v čs. autorském osvědčení č. 217 857 je popsán způsob přípravy imobilizovaných buněk kvasinek s omezením na využití jediného typu organického polymerního sorbentu čs. provenience na bázi polydimethylfenyloxidu /SORFIX/, spočívající v ošetření tohoto sorbentu glutaraldehydem, následného vymytí glutaraldehydu a zakotvení buněk kvasinek kombinací sorpce a kovalentní vazby. Citované autorské osvědčení je tedy omezeno pouze na jediný typ využití daného organického polymerního sorbentu, na jediný typ mikrobiální buňky - kvasinku a jediný způsob imobilizace pomocí sorbovaného glutaraldehydu. Stejným způsobem imobilizované rostlinné buňky, na stejný typ mikroporézního organického polymerního sorbentu, byly popsány v odborné literatuře /Biotechnol. Lett., 3, No. 8 447, 1981/.

Zjistili jsme v nedávné době, že lze výhodně imobilizovat různé mikrobiální a rostlinné buňky, jejich podbunečné částice a buněčné fragmenty a různé enzymy mikrobiálního, rostlinného či

živočišného původu, pomocí reaktivních, ve vodě rozpustných polymerů, obsahujících nejméně dvě primární a/nebo sekundární aminoskupiny v molekule, zejména na bázi polyethyleniminu, polylysinu a hexamethylendiaminu a bifunkčních síťovacích činidel, zejména glutaraldehydu. Tyto, do značné míry univerzální a z ekonomického hlediska přijatelné způsoby imobilizace buněk a enzymů, však v některých případech poskytují měkké preparáty imobilizovaných biokatalyzátorů houbovitého charakteru, s horšími hydrodynamickými vlastnostmi a zvláště za použití buněk vyšších organismů jako výchozího imobilizovaného biologického materiálu, zejména buněk vyšších hub a rostlinných buněk, nebo enzymů atakujících vysokomolekulární substráty /proteázy - bílkoviny, amyloglukosidáza - škrob apod./, poskytují preparáty s nižší biologickou, resp. enzymovou aktivitou a s kratšími operačními poločasy při jejich vsádkovém opakovaném nebo kontinuálním využití požadovaným směrem biotransformace.

Ověřili jsme proto experimentálně možnost využití těchto reaktivních rozpustných polymerů k aktivaci všech mikroporézních polymerních organických a anorganických sorbentů čs. provenience a vypracovali způsoby imobilizace biologicky resp. enzymově aktivních mikrobiálních a rostlinných buněk a enzymů mikrobiálního, rostlinného a živočišného původu, s cílem získání imobilizovaných biokatalyzátorů se zdokonalenými hydrodynamickými a dalšími výhodnými vlastnostmi, umožňujícími jejich průmyslové využití požadovaným směrem biotransformace ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu a v zemědělství.

Způsob imobilizace mikrobiálních a rostlinných buněk a enzymů podle vynálezu spočívá v tom, že částice ve vodě nerozpustných organických polymerů, zejména na bázi polyethylentereftalátu, poly-2,6-dimethylfenyloxydu, poly-6-kaprolaktamu, blokového kopolymeru poly-6-kaprolaktamu s polyethylenoxidem, kopolymeru vinylchloridu a vinylacetátem, polykondensátů melaminu s formaldehydem a močoviny s formaldehydem a anorganických polymerů, zejména na bázi polymerního oxidu křemičitého se zaktivují s chemicky reaktivními ve vodě rozpustnými polymery, které se připraví reakcí ve vodě rozpustných látek obsahujících nejméně 2 primární a/nebo

sekundární aminoskupiny, zejména větveného polyethyleniminu o molekulové hmotnosti 50 000 až 1 000 000, popřípadě polylysinu o molekulové hmotnosti 1 000 až 50 000, lysinu nebo hexamethylen-diaminu a bifunkčních aldehydů dikarboxylových kyselin jako je glutaraldehyd, načež se k aktivovaným částicím nerozpustných polymerních materiálů přidá vodná nebo pufrovaná vodná suspenze celých mikrobiálních nebo rostlinných enzymově aktivních buněk a/nebo vodný nebo pufrovaných vodný roztok enzymu a vzniklý imobilizovaný biokatalysátor se separuje a promyje. K imobilizaci buněk a enzymů se použije ve vodě nerozpustných částic organických a anorganických polymerů o velikosti 0,001 až 5 mm, specifickém povrchu od 1 do 700 m<sup>2</sup>/g a porositě částic od 0,01 do 2,5 cm<sup>3</sup>/g. Aktivace ve vodě nerozpustných částic polymeru zejména na bázi polyethylentereftalátu, poly-2,6-dimethylfenyloxydu, blokového kopolymeru vinylchloridu s vinylacetátem a polymerního oxidu křemičitého se provádí jejich smísením s předem připravenými reaktivními rozpustnými polymery, které se připraví reakcí ve vodě rozpustných látek obsahujících nejméně dvě primární a/nebo sekundární aminoskupiny s bifunkčními aldehydy dikarboxylových kyselin, načež se po odstranění přebytku roztoku vystaví kontaktu s buněčnou suspenzí či roztokem enzymu. Částice polymerů na bázi poly-6-kaprolaktamu, blokového kopolymeru poly-6-kaprolaktamu s polyethylenoxidem a polykondenzátů melaminu s formaldehydem a močoviny s formaldehydem se uvádí do kontaktu s jednotlivými reakčními složkami reaktivních rozpustných polymerů postupně, přičemž v první fázi se částice uvedených polymerů vystaví kontaktu s roztokem polyethyleniminu, polylysinu, lysinu nebo hexamethylen-diaminu a po sorpci těchto látek a po odstranění přebytečného roztoku se tyto částice vystaví účinku bifunkčního aldehydu dikarboxylových kyselin, například glutaraldehydu, načež se po vytvoření reaktivního polymeru na povrchu částic přebytečný roztok opět odstraní a uvedené aktivované polymerní částice se vystaví kontaktu s buněčnou suspenzí, či roztokem enzymů.

Jako výchozího biologického materiálu pro imobilizaci se použije celých neporušených enzymově aktivních buněk mikroorganismů,

zejména grampozitivních a gramnegativních bakterií, aktinomycet, acidoresistentních bakterií, kvasinek a dalších imperfektních hub a enzymově aktivních rostlinných buněk a surových technických nebo do různého stupně čistých enzymů mikrobiálního, rostlinného či živočišného původu.

V následujících příkladech provedení se jako látky obsahující nejméně dvě primární a/nebo sekundární aminoskupiny používá komerčních flokulantů na bázi polyethyleniminu o molekulové hmotnosti 200 000 až 300 000 v koncentraci přibližně 30 hmotnostních procent ve flokulantu, nebo polylysin s molekulovou hmotností od 25 000 do 50 000 či oligomery "polylysinů" vzniklé reakcí technického lysinu s glutaraldehydem.

Enzymové aktivity imobilizovaných biologických materiálů byly hodnoceny za míchání a teploty definovaného množství částic v roztoku substrátu za podmínek měření v oblasti kinetiky nultého řádu enzymové reakce a enzymová aktivita resp. specifická aktivita vyjadřována jako množství vytvořených umolů produktu resp. produktů/mg nebo g vlhké či suché hmoty částic, pokud není v příkladech uvedeno jinak.

Pro způsob imobilizace buněk podle vynálezu lze používat produkčních buněk obsahujících různé enzymy, přičemž je výhodné použití pro imobilizaci buněk mutantních organismů, získaných šlechtěním, selekcí a nahromaďovacími metodami a genetickou manipulací, neboť získané imobilizované preparáty pak mají vysokou specifickou aktivitu.

Imobilizované mikrobiální a rostlinné buňky mohou nést různé enzymové aktivity, zejména hydrolázy, lyázy, izomerázy, dekarboxylázy, oxidoreduktázy a jiné aktivity a/nebo části či celé sekvence enzymů logického sledu biochemické dráhy, zejména degradativního metabolismu, glykolýzy, enzymů katalyzujících biotransformace hormonů, produkci solanových alkaloidů, fytosterolu,  $\beta$ -cytosterolu, kampesterolu, stigmasterolu a dalších látek.



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

#### Příklad 1

Bylo připraveno 100 ml 2 % /hmota/objem/ vodného roztoku polyethyleniminu /Sedipuru CL-930/ a roztok byl vakuově sfiltrován přes porcelánovou fritu S<sub>4</sub> tak, aby byl odstraněn nepatrný nerozpustný podíl obsažený v tomto komerčním flokulantu. Ke 100 ml dokonale rozpuštěného čirého roztoku Sedipuru byl přidán 25 % /objem/objem/ vodný roztok glutaraldehydu tak, aby jeho výsledná koncentrace v uvedeném objemu činila 1 % /objem/objem/. Reakční směs, jejíž pH činilo 6,8, byla přelita do 500 ml skleněné varné baňky jejíž hrdlo bylo překryto hliníkovou fólií a baňka umístěna na rotační třepací stroj o počtu otáček 250/min a směs nepřetržitě míchána po dobu 24 hod. při teplotě 30°C. Tímto postupem byl připraven roztok reaktivního polymeru.

10 g suché hmoty mikroporézního nosiče SORFIX poly-/2,6-dimethylfenyloxydu o průměrné distribuci velikosti částic 0,2 až 0,5 mm, porozitě částic 0,459 cm<sup>3</sup>/g a specifickém povrchu 400 m<sup>2</sup>/g, bylo suspendováno v 100 ml směsi etanol:voda /objemový poměr 1:3/ a ponecháno bobtnat v této směsi přes noc. Následující den byla suspenze částic nosiče vakuově zfiltrována a materiál důkladně promyt jedním litrem vody a odsát.

10 g vlhké hmoty nosiče bylo suspendováno ve 100 ml roztoku reaktivního vodorozpustného polymeru /dále jen RRP/ a po homogenizaci částic byla směs 1 hodinu nepřetržitě míchána na recipročním shakeru a poté ponechána 2 hodiny stát při teplotě místnosti, načež byla vakuově sfiltrována a dobře odsátý aktivovaný nosič byl rozdělen na 5 stejných hmotnostních dílů à 2 g vlhké hmoty do 5ti 50 ml skleněných kádinek. Dále bylo připraveno 5 vodných suspenzí celých nativních buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obsahujících 100, 200, 250, 300 a 400 mg vlhké, dobře odstředěné buněčné hmoty/ml. Potom 4 ml homogenních vodných suspenzí buněk o jejich různé koncentraci bylo přidáno vždy ke 2 g vlhké hmoty aktivovaného nosiče, suspenze promíchána, kádinky překryty fólií a umístěny na reciproký shaker a po dobu 7 hodin nepřetržitě míchány. Po uvedené době byly vzorky postupně několikrát dekantovány

vodou tak dlouho, až nedocházelo k zákalu horní vrstvy kapaliny po kvantitativní sedimentaci částic. Poté byly vzorky postupně přeneseny na Büchnerovu nálevku jejíž dno bylo překryto textilním materiálem /kalolísová plachetka/ a vakuově dobře odsáty a na nálevce ještě důkladně promyty vodou, po odsátí usušeny do konstantní hmotnosti /105°C/ a výtěžek imobilizace buněk orientačně sledován v závislosti na jejich koncentraci při stejné hmotnosti stejným způsobem aktivovaného nosiče, podle přírůstku vázaného dusíku. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

| Koncentrace buněk<br>/mg/ml/ | 100  | 200  | 250  | 300  | 400  |
|------------------------------|------|------|------|------|------|
| Přírůstek dusíku<br>/%/      | 1,25 | 2,03 | 2,68 | 3,02 | 3,16 |

Z uvedených hodnot v tabulce vyplývá logika volby koncentrace buněk 300 mg/ml na množství stejným způsobem aktivovaného nosiče, která je použita v následujících příkladech provedení, kde jsou jako vázaný materiál použity mikrobiální buňky.

## Příklad 2

Vzhledem ke skutečnosti, že doba styku buněk s aktivovaným nosičem, jak je popsána v příkladu 1, byla empiricky zvolena /7 hodin/, byla dále sledována časová závislost kontaktu buněk se stejným typem a stejným způsobem aktivovaného nosiče.

100 ml RRP bylo připraveno způsobem uvedeným v příkladu 1, stejně tak jako způsob ošetření stejného typu nosiče před aktivací včetně aktivace samotné. K 5ti stejným množstvím dobře odsátého, vlhkého, aktivovaného nosiče byly přidány vždy à 4 ml vodné suspensione buněk obsahující 300 mg vlhké hmoty nativních kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a imobilizace byla prováděna mícháním způsobem jak je uvedeno v příkladu 1. V různých časových intervalech byly reakční směsi postupně dekantovány, vakuově sfiltrvány, promyty a sušeny způsobem, který je rovněž uveden v příkladu 1 a optimální doba kontaktu buněk s aktivovaným nosičem kalkulována z množství zachyceného biologického dusíku. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

| Doba kontaktu<br>/h/    | 1    | 2    | 3    | 4    | 24   |
|-------------------------|------|------|------|------|------|
| Přírůstek dusíku<br>/‰/ | 3,72 | 3,73 | 3,73 | 3,68 | 3,55 |

Z hodnot uvedených v tabulce byla zvolena experimentálně nalezená doba kontaktu buněk s aktivovaným nosičem 3 hodiny, která je použita v následujících příkladech provedení, stejně tak jako experimentálně nalezená koncentrace buněk uvedená v příkladu 1.

### Příklad 3

Bylo připraveno 400 ml RRP postupem uvedeným v příkladu 1. Materiál SORFIX /10 g/ byl před aktivací ošetřen směsí ethanol/voda rovněž jak je uvedeno v příkladu 1. Další mikroporézní nosiče typu SILOXID /s různou distribucí velikostí částic/ a typu SORSILEN v množství à 10 g suché hmoty, byly smočeny přibližně 1 litrem vody, několikrát dekantovány a vakuově dobře sfiltrovány. Dále bylo připraveno 100 ml vodné suspence *Saccharomyces cerevisiae* s invertázovou aktivitou v množství 300 mg vlhké hmoty buněk/ml. Aktivita invertázy v této suspensi činila 13,8 j/mg suché hmoty buněk.

Vždy 10 g vlhké hmoty dobře odsátých mikroporézních nosičů zmíněných komerčních názvů bylo suspendováno v 100 ml RRP a suspenze částic těchto materiálů aktivována způsobem popsáním v příkladu 1. Po aktivaci a odděleném odsátí RRP od aktivovaných nosičů byly tyto odděleně suspendovány vždy ve 20 ml vodné suspenze buněk a po homogenizaci a suspendaci byla imobilizace buněk prováděna 1 hodinovým mícháním a následujícím 2 hodinovým stáním při teplotě místnosti. Poté byly suspenze odděleně několikrát dekantovány vodou tak dlouho, až nedocházelo k zákalu horní vrstvy kapaliny po kvantitativní sedimentaci částic. Poté byly postupně materiály separovány filtrací přes textilní materiál na filtru ještě důkladně promyty vodou a dobře odsáté vlhké materiály zváženy a dále analyzovány. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

| Typ nosiče                                                        | Poly-/2,6-di-methyl/fenyl-oxid /SORFIX/ | Polymerní oxid křemičitý I /SILOXID/II | Polyethylen-tereftalát /SORSILEN/ |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|
| Prům. distribuce velikosti částic /mm/                            | 0,2 až 0,5                              | I 0,2 až 0,5<br>II 0,01 až 0,80        | 0,02 až 0,03                      |
| Porosita částic /cm <sup>3</sup> /g/                              | 0,459                                   | 0,048<br>neznámá                       | 0,800                             |
| Specifický povrch /m <sup>2</sup> /g/                             | 400,0                                   | 62,0<br>100,0                          | 66,0                              |
| /+/ Spec. aktivita u imobil.kvasinek na nosičích /j/g suché hmoty | 363,0                                   | 110,0<br>263,0                         | 145,0                             |
| Přírůstek dusíku /%/                                              | 0,09                                    | 0,43<br>0,11                           | 0,26                              |

/+/ Aktivita invertázy se sacharózou jako substrátem byla stanovena podle J.B. Lloyda a W.J. Whelana /Analyt. Biochem., 30, No 3, 467, 1969/.

#### Příklad 4

Byla provedena imobilizace celých bakteriálních buněk *Escherichia coli* s benzylpenicilinamidohydrolázovou aktivitou na pevné částice mikroporézních nosičů typu SORFIX, SILOXID a SORSILEN aktivovaných pomocí RRP. Příprava RRP, smáčení nosičů a jejich aktivace, koncentrace výchozího buněčného materiálu o specifické aktivitě 14,5 j/mg suché hmoty buněk, imobilizační technika, dekantace, promývání a filtrace materiálů imobilizovaných buněk byla provedena jako v příkladu 3. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

| Typ nosiče                             | Poly-/2,6-di-methyl/fenyl-oxid /SORFIX/ | Polymerní oxid křemičitý /SILOXID/ |          | Polyethylen-tereftalát /SORSILEN/ |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------|----------|-----------------------------------|
| Prům. distribuce velikosti částic /mm/ | 0,2 až 0,5                              | 0,2-0,5                            | 0,01-0,8 | 0,02-0,03                         |
| Porosita částic /cm <sup>3</sup> /g/   | 0,459                                   | 0,048                              | neznámá  | 0,80                              |
| Specifický povrch /m <sup>2</sup> /g/  | 400,0                                   | 62,0                               | 100,0    | 66,0                              |

|                                                                                          |        |        |        |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| /+/ Spec. aktivita<br>enzymu u imobil.<br>bakterií na nosi-<br>čích /j/g suché<br>hmoty/ |        |        |        |        |
|                                                                                          | 2760,0 | 8830,0 | 7560,0 | 9530,0 |
| Prírůstek dusíku<br>/%/                                                                  |        |        |        |        |
|                                                                                          | 5,10   | 5,44   | 4,82   | 4,49   |

/+/ Aktivita benzylpenicilinamidohydrolázy s benzylpenicilinem jako substrátem byla měřena podle Balasinghama et al., Biochem. Biophys. Acta, 276, 250, 1972.

#### Příklad 5

Na rozdíl od postupů uvedených v předcházejících příkladech provedení byly v tomto případě pro přípravu RRP použity 2 typy poly-L-lysinů lišících se molekulovou hmotností, /a/ polylysin hydrochlorid o molekulové hmotnosti od 40 000 do 50 000 a /b/ polylysin o molekulové hmotnosti 26 200. Oba typy polylysinů byly připraveny v Ústavu organické chemie a biochemie ČSAV. Reaktivní polymer byl v případě /a/ získán 24 hod. reakcí vodného roztoku reakční směsi v poměru koncentrací 0,1 % polylysin . HCl /hmota/ objem/ a 0,3 % glutaraldehyd /objem/objem/ v celkovém objemu 20 ml za nepřetržitého míchání na třepacím stroji při teplotě 30°C a v případě /b/ za stejných reakčních podmínek jako /a/ s tím rozdílem, že 20 ml vodného roztoku reakční směsi obsahovalo 1 % polylysinu /hmota/objem/ a 0,5 % glutaraldehydu /objem/objem/. K aktivaci mikroporézního nosiče typu SORFIX, jehož fyzikálně-chemická a fyzikální charakteristika je uvedena v příkladu 1, bylo použito à 10 g vlhko hmoty částic nosiče, které byly smíchány s 20 ml každého z popsáním způsobem připravených RRP /a; b/. Aktivace nosiče, způsob imobilizace vodné suspenze buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* s invertázovou aktivitou, včetně koncentrace buněk a dekantace, promytí a filtrace získaného materiálu byla provedena způsobem uvedeným v příkladu 3. U získaného materiálu byl stanoven přírůstek biologického dusíku a specifická aktivita invertázy u imobilizovaných buněk. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

|            |                                       |
|------------|---------------------------------------|
| Typ nosiče | Poly-/2,6-dimethyl/fenyloxid /SORFIX/ |
|------------|---------------------------------------|

| Použitý typ RRP pro aktivaci částic nosiče                                               | /a/     | /b/     |
|------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|
| /+/ Specifická aktivita invertázy u imobilizovaných kvasínek na nosiči /j/g suché hmoty/ | 9 492,3 | 1 901,3 |
| Přírůstek dusíku /%/                                                                     | 3,39    | 1,57    |
| /+/ uvedeno v příkladu 3.                                                                |         |         |

#### Příklad 6

Byla provedena řada spektrofotometrických měření sledujících kinetiku reakce L-lysinu . HCl s glutaraldehydem za tvorby barevných Schiffových bází. Na základě získaných výsledků byl použit RRP, pro následnou aktivaci popsaných mikroporézních nosičů, který byl získán 24 hod. reakcí směsi reakčních složek v aktuálním poměru koncentrací 5 % /hmota/objem/ L-lysinu . HCl a 4 % /objem/objem/ glutaraldehydu v prostředí 60 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 8,0, za neustálého míchání na třepacím stroji při teplotě 30°C.

Vždy 10 g vlhké hmoty mikroporézních nosičů typu SORFIX, SILOXID a SORSILEN bylo odděleně smícháno s 20 ml tohoto RRP. Aktivace nosičů, technika imobilizace, včetně hmotnostních poměrů vodné suspenze buněk ku hmotě aktivovaných nosičů, dekantace, promytí a separace byla provedena jako v příkladu 3. K imobilizaci bylo použito buněk kvasínek s invertázovou aktivitou, rovněž jak je uvedeno v příkladu 3. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

| Typ nosiče                                                                    | Poly-/2,6-di-methyl/fenyl-oxid /SORFIX/ | Polymerní oxid křemičitý /SILOXID/ | Polyethylen-tereftalát /SORSILEN/ |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Prům. distribuce velikosti částic /mm/                                        | 0,2 až 0,5                              | 0,01 až 0,80                       | 0,02 až 0,03                      |
| Porosita částic /cm <sup>3</sup> /g/                                          | 0,459                                   | neznámá                            | 0,800                             |
| Specifický povrch částic /M <sup>2</sup> /g/                                  | 400,0                                   | 100,0                              | 66,0                              |
| /+/ Spec. aktivita invertázy u imobil. kvasínek na nosičích /j/g suché hmoty/ | 2428,9                                  | 56,2                               | 1831,8                            |

|                         |      |      |      |
|-------------------------|------|------|------|
| Přírůstek dusíku<br>/%/ | 1,47 | 1,31 | 1,76 |
|-------------------------|------|------|------|

/+/- Uvedeno v příkladu 3.

#### Příklad 7

Pro imobilizaci celých buněk bylo, na rozdíl od předchozích příkladů, použito pevných mikroporézních nosičů, připravených na bázi polyamidů, které obsahují primární a sekundární aminoskupiny. Bylo použito tří typů nosičů komerčního označení APA, AMIDAP a SILONA. Chemické složení těchto polymerů je uvedeno níže. Způsob přípravy RRP a aktivace částic těchto nosičů bylo, na rozdíl od dříve uvedených příkladů, provedeno v přímém kontaktu s částicemi nosičů. Z řady zkoumaných způsobů aktivace těchto typů mikroporézních polyamidových nosičů byl zvolen postup, který poskytuje nejvyšší zachycenou specifickou aktivitu imobilizovaných buněk, spočívající v tom, že v první fázi se na povrch částic nosiče adsorbuje polyethylenimin a v druhé fázi se částice nosiče ošetří glutaraldehydem za současné chemické aktivace částic nosičů podle následujícího postupu.

Vždy 10 g uvedených typů polyamidových nosičů, které byly promyty vodou a vakuově odsáty, bylo suspendováno ve 40 ml 2 % /hmota/objem/ vakuově sfiltrovaného vodného roztoku Sedipuru CL-930 a suspenze byla 1 hod. míchána při teplotě místnosti. Poté byly částice nosičů odděleně vakuově odsáty a suspendovány vždy ve 40 ml 1 % /objem/objem/ vodného roztoku glutaraldehydu. Po 1 hod. reakci v průběhu nepřetržitého míchání při teplotě místnosti byly částice aktivovaných nosičů vakuově sfiltrovány a použity pro imobilizaci buněk. Buněčná suspenze *Saccharomyces cerevisiae*, o koncentraci 300 mg vlhké hmoty buněk/ml destilované vody, byla v množství 10 ml smíchána vždy s 5 g vlhkého odsátého, aktivovaného nosiče a umístěna na laboratorní shaker a dále bylo při imobilizaci postupováno, jak je uvedeno v předchozích příkladech, s tím rozdílem, že byla sledována účinnost imobilizace buněk v závislosti na době jejich kontaktu s částicemi aktivovaných nosičů v průběhu nepřetržitého míchání při teplotě místnosti. Stupeň imobilizace byl zjišťován ve dvou časových intervalech, 1 a 3 hodiny, po předchozí kvantitativní dekantaci, promytí a odsátí způ-

soby uvedenými v předchozích případech provedení. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

| Typ nosiče                                               | Poly-6-kaprolaktam, polymerační stupeň 160 /APA/ |        | Kopolymer poly-6-kaprolaktamu s polyethylenoxidem /AMIDAP/ |         | Poly-6-kaprolaktam, polymerační stupeň 90 /SILONA/ |       |
|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------|------------------------------------------------------------|---------|----------------------------------------------------|-------|
| Prům. distribuce velikosti částic /mm/                   | 0,25                                             |        | 0,2 až 0,5                                                 |         | 0,5                                                |       |
| Porosita částic /cm <sup>3</sup> /g/                     | 0,67                                             |        | 0,393                                                      |         | neznámá                                            |       |
| Spec. povrch částic /m <sup>2</sup> /g/                  | 6,6                                              |        | 1,6 až 2,0                                                 |         | 0,5                                                |       |
| Doba kontaktu /h/                                        | 1                                                | 3      | 1                                                          | 3       | 1                                                  | 3     |
| /+/ Spec. aktivita                                       |                                                  |        |                                                            |         |                                                    |       |
| invertázy imobil. kvasinek na nosičích /j/g suché hmoty/ | 8353,3                                           | 1900,0 | 105,0                                                      | 10473,6 | 438,0                                              | 152,0 |
| Přírůstek dusíku /%/                                     | 0,27                                             | 0,28   | 0,58                                                       | 0,52    | 0,68                                               | 1,17  |

/+/ Uvedeno v příkladu 3.

#### Příklad 8

Byla připravena vodná suspenze čerstvých nativních promytých buněk imperfektní vláknité houby *Aspergillus niger* o koncentraci 300 mg vlhké hmoty buněk/ml vodné suspenze. Specifická aktivita invertázy u tohoto mikroorganismu činila 0,3 j/g suché hmoty buněk. Buněky byly sklizeny po 24 hod. submersní jednorázové kultivace ve fermentačním tanku za podmínek zabráňujících růstu buněk v peletách v živné půdě se sacharózou jako zdrojem uhlíku. Dále bylo připraveno 50 ml vodného roztoku RRP 24 hod. reakcí reakčních složek Sedipur CL-930/glutaraldehyd v poměru jejich koncentrací a způsobem uvedeným v příkladu 1.

Vždy k 20 g vlhké, dobře odsáté hmoty promytých mikroporézních nosičů typu SORFIX a SORSILEN bylo přidáno 25 ml RRP a aktivace nosičů byla prováděna mícháním a stáním způsobem uvedeným v příkladu 1, včetně popsaného způsobu separace chemicky aktivovaných částic obou typů nosičů.

20 g vlhké, odsáté hmoty promytého mikroporézního nosiče typu SILONA, bylo aktivováno v přímém sekvenčním kontaktu způsobem



principiálně popsáným v příkladu 7, tak, že toto množství bylo suspendováno v 80 ml sfiltrovaného 2 % /hmota/objem/ vodného roztoku SEDIPURU CL-930, 10 min. směs byla míchána a poté suspenze ponechána 50 min. stát, částice odsáty a k dobře odsátým částicím bylo přidáno 80 ml 1 % /objem/objem/ vodného roztoku glutaraldehydu a dále bylo postupováno v aktivaci mícháním a stáním ve stejných časových intervalech, načež byla provedena separace částic nosiče a jejich kvantitativních odsátí.

K 20 g vlhké hmoty popsáným způsobem aktivovaných nosičů typu SORFIX, SORSILEN a SILONA bylo přidáno 40 ml vodné buněčné suspenze *Aspergillus niger* a imobilizace buněk probíhala 1 hod. mícháním a 2 hod. stáním. Poté byly částice jednotlivých preparátů imobilizovaných buněk vakuově sfiltrovány přes textilní materiál, několikrát dekantovány vždy několika litry destilované vody, znovu odsáty a několikrát důkladně promyty vodou. Dále byly preparáty hodnoceny na specifickou aktivitu invertázy a obsah biologického dusíku. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

| Typ nosiče                                                                                    | Poly-/2,6-di-methyl/fenyl-oxid<br>/SORFIX/ | Polyethylen-tereftalát<br>/SORSILEN/ | Poly-6-kaprolaktam; polymerační stupeň 90<br>/SILONA/ |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Prům.distribuce velikosti částic /mm/                                                         | 0,5 až 1,0                                 | 0,5 až 1,2                           | 0,5                                                   |
| Porosita částic /cm <sup>3</sup> /g/                                                          | 0,459                                      | 2,14                                 | 0,5                                                   |
| Spec.povrch částic /m <sup>2</sup> /g/                                                        | 400,0                                      | 56,0                                 | 0,5                                                   |
| /+/ Spec.aktivita invertázy u imobil. vláken <i>A. niger</i> na nosičích<br>/j/g suché hmoty/ | $1,5 \cdot 10^{-3}$                        | $1,2 \cdot 10^{-3}$                  | $7,3 \cdot 10^{-4}$                                   |
| Přírůstek dusíku /%/                                                                          | 0,06                                       | 0,08                                 | 1,32                                                  |
| /+/ Uvedeno v příkladu 3.                                                                     |                                            |                                      |                                                       |

#### Příklad 9

Z 24 hodinové a 48 hodinové kultury buněk *Aspergillus niger* s invertázovou aktivitou, byly připraveny homogenní vodné suspenze promytých vláken o koncentraci buněk 300 mg vlhké hmoty/ml

suspenze. Specifická aktivita invertázy buněk 24 hod. kultury činila 0,3 j/g suché hmoty, specifická aktivita téhož enzymu v buňkách 48 hod. kultury činila 0,138 j/g suché hmoty buněk.

Dále byl připraven RRP na bázi polylysin/glutaraldehyd, principiálně způsobem popsaným v příkladu 5 tak, že bylo předem připraveno 25 ml 1 % /hmota/objem/ roztoku polylysinu s molekulovou hmotností 26 200, který byl rozpuštěn v 0,1 M tris pufru pH 8,0 a do tohoto roztoku byl přidán 25 % vodný roztok glutaraldehydu tak, aby jeho počáteční koncentrace v reakční směsi činila 0,5 % /objem/objem/, přičemž reakce probíhala za nepřetržitého míchání po dobu 24 hod. při teplotě 30°C.

20 g vlhké hmoty polymerního nosiče typu SORFIX bylo smícháno s 25 ml zmíněným způsobem připraveného RRP a aktivace částic nosiče probíhala 1 hod. mícháním a 2 hod. stáním při teplotě místnosti, načež byly částice vakuově odsáty a produkt byl rozdělen na 2 stejné hmotnostní díly /à 10 g vlhké hmoty/ a k jedné části bylo přidáno 20 ml 24 hod. kultury buněčné suspenze, k druhé části 20 ml 48 hod. kultury buněčné suspenze téhož mikroorganismu. Imobilizace buněk probíhala stejným způsobem jako aktivace nosičů, tj. 1 hod. míchání a 2 hod. stání při teplotě místnosti. Poté byly oba materiály odděleně separovány, dekantovány a promyty vodou způsobem popsaným v předchozích příkladech provedení. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

| Typ nosiče                                                                                        | Poly-/2,6-dimethyl/fenyloxid<br>/SORFIX/ |                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------|
| Distribuce velikosti částic<br>/mm/                                                               | 0,5 až 1,0                               |                      |
| Porosita částic<br>/cm <sup>3</sup> /g/                                                           | 0,459                                    |                      |
| Specifický povrch /m <sup>2</sup> /g/                                                             | 400,0                                    |                      |
| Stáří kultury buněčných<br>vláken <i>A. niger</i> /h/                                             | 24                                       | 48                   |
| /+/ Výchozí spec. aktivita<br>invertázy u nativních vlá-<br>ken <i>A. niger</i> /j/g suché hmoty/ | $3 \cdot 10^{-1}$                        | $1,38 \cdot 10^{-1}$ |
| /+/ Spec. aktivita invertázy<br>u imobil.vláken <i>A. niger</i> na<br>nosičích /j/g suché hmoty/  | $1,5 \cdot 10^{-3}$                      | $2,8 \cdot 10^{-2}$  |
| Přírůstek dusíku /%/                                                                              | 0,10                                     | 0,13                 |

/+/ Uvedeno v příkladu 3.

#### Příklad 10

Bylo připraveno 50 ml RRP na bázi polyethylenimin/glutaraldehyd 24 hod. reakci obou reakčních složek způsobem a za podmínek uvedených v příkladu 1.

5 g vlhké hmoty polymerního nosiče typu SORFIX /Poly-2,6-dimethylfenyloxid/ o velikosti částic 0,25 až 0,5 mm, specifickém povrchu 600 m<sup>2</sup>/g a porositě 0,5 cm<sup>3</sup>/g bylo po předchozím smočení, nabotnění, promytí a odsátí způsobem uvedeným v příkladu 1, smícháno s 50 ml RRP a aktivace nosiče probíhala 1 hod. mícháním a 2 hod. stáním způsobem rovněž uvedeným v příkladu 1 včetně separace částic aktivovaného nosiče.

Suspenze jednobuněčné kultury rostlinných buněk *Solanum aviculare*, získaná aseptickou kultivací za konstantní aerace bez foperiody, byla sfiltrována, jednotlivé buňky po oddělení média promyty 0,05 M fosfátovým pufrům obsahujícím 0,75 M KCl o pH 5,7 a připravena suspenze v tomto pufru obsahuje 150 mg vlhké hmoty promytých rostlinných buněk/ml. K 3 g vlhké odsáté hmoty aktivovaného nosiče bylo přidáno 12 ml suspenze rostlinných buněk a dále bylo při imobilizaci postupováno 1 hod. mícháním a 2 hod. stáním za podmínek a postupem uvedeným v příkladu 2. Poté byl imobilizovaný materiál několikrát dekantován zmíněným pufrům, sfiltrován, na filtru odsát a znovu tímto pufrům promyt.

Získaný imobilizovaný materiál byl naplněn do skleněné kolony opatřené pláštěm na temperaci /Pharmacia Fine Chemicals K 26/40/ a pevným ložem tohoto biokatalyzátoru bylo směrem shora dolů recirkulačním způsobem čerpáno 100 ml 8 % /hmota/objem/ sterilního vodného roztoku sacharózy rychlostí 1,5 ml/min při teplotě 26°C. Ve 24 hod. časových intervalech nepřetržité recirkulace byla analyticky sledována extracelulární produkce  $\beta$ -cytosterolu, kampesterolu, stigmasterolu a další, chemicky blíže neidentifikované sterolové komponenty, pomocí HPLC chromatografie popsané Jirků a spol. /Biotechnol. Lett., 3, No. 8, 447, 1981/. Bylo zjištěno, že během sedmidenní nepřetržité recirkulace pevným ložem biokatalyzátoru dochází k extracelulární produkci uvedených komponent v rozmezí koncentrací 10 až 20 ug/24 hod/100 ug vlhké hmoty imobilizovaných rostlinných buněk nezměněnou intenzitou a v zachovaných biorytmech.

#### Příklad 11

234 059

5 g vlhké promyté hmoty anorganického nosiče typu SILOXID /polymerní oxid křemičitý/ o průměrné velikosti částic 0,2 až 0,5 mm, specifickém povrchu  $62 \text{ m}^2/\text{g}$  a porositě  $0,048 \text{ cm}^3/\text{g}$  bylo aktivováno 50 ml RRP na bázi polyethylenimin/glutaraldehyd jako v předcházejícím příkladu. Imobilizace rostlinných buněk *S. aviculare* byla provedena rovněž jako v příkladu 10 včetně separace, dekantace a promytí uvedeným puforem.

Extracelulární biochemická aktivita stejných steroidních sloučenin byla sledována v recirkulačním reaktoru s pevným ložem biokatalyzátoru za podmínek a způsobem uvedeným v příkladu 10.

Koncentrace uvedených sloučenin se pohybovala v rozmezí 8 až 16  $\mu\text{g}/24 \text{ h}/100 \text{ ug}$  vlhké hmoty imobilizovaných rostlinných buněk a extracelulární produkce probíhala nezměněnou intenzitou a v zachovaných biorytmech po celou dobu 7 denního sledování.

#### Příklad 12

Vždy 0,5 g suché hmoty polymerních nosičů typu APA, AMIDAP, SORFIX, SORSILEN a PVC-PVA 37 /chemické složení, fyzikální a fyzikálně chemické charakteristiky nosičů jsou uvedeny níže/ bylo suspendováno v 10 ml 96 % ethanolu a ponecháno stát po dobu 30 min. za občasného promíchání. Poté byly nosiče suspendovány ve vodě, sfiltrovány, na filtru důkladně promyty vodou a vakuově odsáty.

Dále bylo připraveno 50 ml RRP na bázi polyethylenimin/glutaraldehyd principiálně způsobem uvedeným v příkladu 1 s těmi rozdíly, že poměr aktuálních koncentrací reakčních složek činil 4 % /hmota/objem/ Sedipur CL-930 a 2 % /objem/objem/ glutaraldehyd, reakční doba byla 16 hod. a reakční teplota byla  $28^\circ\text{C}$ . Promyté vlhké částice jednotlivých nosičů byly odděleně smíchány vždy s 10 ml popsáním způsobem získaného RRP a aktivace materiálů probíhala za neustálého míchání při  $25^\circ\text{C}$  po dobu 16 hod. Po uvedené době byly jednotlivé nosiče dekantovány 3krát 50 ml vody a vakuově odsáty. Bylo získáno 1,2 až 1,4 g vlhké hmoty jednotlivých aktivovaných materiálů.

Vždy k 0,5 g vlhké hmoty promytých aktivovaných nosičů bylo přidáno 20 ml roztoku chymotrypsinu rozpuštěného v 0,05 M fosfátovém pufru o pH 7,0. Roztok obsahoval 10 mg/ml bílkovin o specifické aktivitě 4,6 j/mg. Imobilizace této proteázy na aktivova-

ných nosičích probíhala v průběhu nepřetržitého míchání po dobu 18 hodin při teplotě 28°C. Poté byly jednotlivé materiály odděleně vakuově sfiltrvány, na filtru promyty vždy 2krát 50 ml vody, 2krát 50 ml 1M roztoku NaCl, 2krát 50 ml vody a dobře odsáty. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

| Typ nosiče                                                                                 | Poly-6-ka-<br>prolaktam;<br>polymerač-<br>ní stupeň<br>160 | Kopolymer<br>poly-6-<br>kaprolak-<br>tamu s po-<br>lyethylen-<br>oxidem | Poly-2,6-<br>dimethyl-<br>fenyloxid | Polyethy-<br>lenter-<br>ftalát | Kopolymer<br>vinylchlo-<br>ridu s vi-<br>nylacetá-<br>tem obsa-<br>hující 20 %<br>vinylacetá-<br>tových jed-<br>notek |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Označení                                                                                   | /APA/                                                      | /AMIDAP/                                                                | /SORFIX/                            | /SORSILEN/                     | /PVC-PVA 37/                                                                                                          |
| Prům. di-<br>stribuce<br>velikosti<br>částic<br>/mm/                                       | 0,2 až 0,5                                                 | 0,2 až 0,5                                                              | 0,2 až 0,5                          | 0,5                            | 0,25 až 1,2                                                                                                           |
| Porosita<br>částic<br>/cm <sup>3</sup> /g/                                                 | 0,388                                                      | 0,420                                                                   | 0,459                               | 2,454                          | neznámá                                                                                                               |
| Specifický<br>povrch částic<br>/m <sup>2</sup> /g/                                         | 6,0                                                        | 7,4                                                                     | 575                                 | 100                            | 7,8                                                                                                                   |
| /+/ Spec.<br>aktivita<br>imobil. chy-<br>motrypsinu<br>na nosičích<br>/j/g vlhké<br>hmoty/ | 26,0                                                       | 27,0                                                                    | 33,0                                | 32,0                           | 23,0                                                                                                                  |

/+/ Proteolytická aktivita rozpustného a imobilizovaného chymotrypsinu s kaseinem jako substrátem byla měřena podle Methods of Enzymatic Analysis, Bergmayer, H. U., /edit./, str. 1006, Verlag Chemie, 1974.

### Příklad 13

RRP byl připraven způsobem uvedeným v příkladu 12. Stejně množství a stejné typy nosičů, jejichž chemické, fyzikální a fyzikálně chemické charakteristiky jsou uvedeny v příkladu 12, byly aktivovány rovněž způsobem uvedeným v příkladu 12, včetně jejich separace a promytí. Imobilizace roztoku neutrální proteázy z *Bacillus* sp., v 0,05 M fosfátovém pufru o pH 7,0 a aktivitě 1,15

j/mg bílkovin, byla provedena rovněž stejným způsobem a za podmínek jak je uvedeno v příkladu 12, včetně promytí vodou a roztokem NaCl a separace imobilizovaného enzymu. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

|                                                                             |      |        |        |          |            |  |
|-----------------------------------------------------------------------------|------|--------|--------|----------|------------|--|
| /+/ Označení                                                                |      |        |        |          |            |  |
| nosiče                                                                      | APA  | AMIDAP | SORFIX | SORSILEN | PVC-PVA 37 |  |
| /+/ Spec. aktivita imobil. neutrální proteázy na nosičích /j/g vlhké hmoty/ |      |        |        |          |            |  |
|                                                                             | 26,0 | 18,0   | 33,0   | 35,0     | 31,0       |  |
| /+/ Uvedeno v příkladu 12.                                                  |      |        |        |          |            |  |

#### Příklad 14

Nosiče typu SORFIX, SORSILEN a PVC-PVA 37, jejichž chemické a fyzikální charakteristiky jsou uvedeny v příkladu 12, byly aktivovány způsobem a za podmínek uvedených rovněž v příkladu 12, způsob /a/, a mícháním se 4 % /objem/objem/ vodným roztokem glutaraldehydu 18 hod. při teplotě 28°C, principiálně způsobem uvedeným v čs. autorském osvědčení č. 214 096, způsob /b/. Promyté částice aktivované oběma způsoby /a; b/ byly v množství 0,5 g vlhké hmoty odděleně suspendovány ve 20 ml 0,05 M fosfátového pufru o pH 7,0 obsahujícího benzylpenicilinamidohydrolázu o obsahu bílkovin 100 mg/ml a specifické aktivitě enzymu 300 j/mg bílkovin. Po 20 hod. nepřetržitého míchání při 25°C byly nosiče promyty a odsáty způsobem uvedeným v příkladu 12. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

| /+/ Označení                                                                                |        |      |          |      |            |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------|------|----------|------|------------|------|
| nosiče                                                                                      | SORFIX |      | SORSILEN |      | PVC-PVA 37 |      |
| Způsob aktivace                                                                             | /a/    | /b/  | /a/      | /b/  | /a/        | /b/  |
| Spec. aktivita imobiliz. benzylpenicilinamidohydrolázy na nosičích /j/mg vlhké hmoty/, /++/ | 0,25   | 0,24 | 3,48     | 1,85 | 0,22       | 0,22 |

/+/ Uvedeno v příkladu 12

/a/ Předmětný způsob aktivace nosičů pomocí RRP

/b/ Kontrolní způsob aktivace nosičů vycházející z čs. AO 214 096

/++/ Aktivita rozpustné a imobilizované benzylpenicilinamidohydrolázy s benzylpenicilinem jako substrátem byla měřena podle Bala-singhama a spol. Biochim. Biophys. Acta, 276, 250, 1972.

#### Příklad 15

Nosiče typu SORFIX a SORSILEN, jejichž chemické a fyzikální charakteristiky byly uvedeny v příkladu 12, byly aktivovány RRP o složení a způsobem uvedeným rovněž v příkladu 12, včetně sepa-race a způsobu promytí aktivovaných částic vodou, roztokem NaCl a opět vodou.

Vždy 0,5 g vlhké hmoty aktivovaných promytých mikroporézních nosičů bylo odděleně suspendováno ve 20 ml roztoku enzymu amylo-glukosidázy v 0,05 M fosfátovém pufru o pH 7,2, získané srážením síranem amonným a odsolením ultrafiltrací z komerčního preparátu AMG 150 L firmy NOVO Terapeutisk /Dánsko/. Roztok obsahoval 9 mg/ml bílkovin, aktivita rozpustné amyloglukosidázy činila 12 j/ml. Imobilizace probíhala za nepřetržitého míchání po dobu 18 hodin při teplotě 12°C. Po uvedené době byly imobilizované materiály promyty 2krát 50 ml vody, 2krát 50 ml 1 M roztoku NaCl a poté opět vodou a dobře odsáty. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

| Typ nosiče<br>/+/                                                                     | Poly-/2,6-dimethyl/-<br>fenyloxid<br>/SORFIX/ | Polyethylentere-<br>ftalát<br>/SORSILEN/ |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------|
| /++/ Spec. aktivita<br>imobil. amyloglukosi-<br>dázy na nosičích<br>/j/g vlhké hmoty/ | 31,0                                          | 15,0                                     |

/+/ Uvedeno v příkladu 12

/++/ Aktivita rozpustné a imobilizované amyloglukosidázy s roz-pustným škrobem jako substrátem byla měřena podle "GLUCOSE SIRUPE", NOVO Enzyme in der Stärke- Industrie, Novo Ind., Copenhagen, 1976.

#### Příklad 16

Organické mikroporézní nosiče typu SORFIX a SORSILEN a anor-ganický mikroporézní nosič typu SILOXID byly aktivovány způsobem uvedeným v příkladu 3, včetně složení a způsobu přípravy RRP,

způsob /a/. Tytéž nosiče byly aktivovány 15 hod. mícháním se 4 % /objem/objem/ vodným roztokem glutaraldehydu při teplotě 30°C, principiálně způsobem uvedeným v čs. autorském osvědčení č. 214 096, způsob /b/. Všechny 3 typy nosičů aktivované oběma popsánymi způsoby byly separátně odsáty a každý ze 6 materiálů rozdělen na dva stejné hmotnostní díly /à 1 g/, celkem tedy na 12 stejných hmotnostních podílů. Šest podílů oběma způsoby aktivovaných částic bylo promyto 250 ml destilované vody, 1 M roztokem NaCl a opět vodou a dobře odsáty a smíchání s 10 ml vodného roztoku kvasničné invertázy o koncentraci bílkovin 11,5 mg/ml a aktivitě 86 j/ml a imobilizace enzymu probíhala 1 hod. mícháním a 2 hod. stáním při teplotě místnosti. Zbývajících 6 hmotnostních podílů dobře odsátých avšak nepromytých, oběma způsoby aktivovaných částic /a; b/ bylo suspendováno 10 ml roztoku uvedeného enzymu o stejné aktivitě a koncentraci bílkovin, přičemž imobilizace probíhala opět 1 hod. mícháním a 2 hod. stáním popsáným způsobem.

Po uvedené době bylo všech 12 vzorků imobilizovaných materiálů dobře vakuově odsáto přes textilní materiál a promyto vždy 200 ml vody, 200 ml 1 M roztoku NaCl a opět vodou a materiály dobře vakuově odsáty. U získaných materiálů imobilizovaného enzymu byla hodnocena specifická aktivita imobilizované invertázy. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

| Typ nosiče                                                                                      | Poly-/2,6-dimethyl/-<br>fenyloxid<br>/SORFIX/ |      | Polyethylen-<br>tereftalát<br>/SORSILEN/ |     | Polymerní oxid<br>křemičitý<br>/SILOXID/ |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------|------------------------------------------|-----|------------------------------------------|------|
| Prům.distr.<br>velikosti<br>částic /mm/                                                         | 0,5 až 1,0                                    |      | 0,5 až 1,2                               |     | 0,2 až 0,5                               |      |
| Porosita čás-<br>tic /cm <sup>3</sup> /g/                                                       | 0,459                                         |      | 2,14                                     |     | 0,048                                    |      |
| Spec. povrch<br>částic /m <sup>2</sup> /g/                                                      | 400,0                                         |      | 56,0                                     |     | 62,0                                     |      |
| Způsob akti-<br>vace nosičů                                                                     | /a/                                           | /b/  | /a/                                      | /b/ | /a/                                      | /b/  |
| Promytí čás-<br>tic po akti-<br>vací                                                            | +                                             | -    | +                                        | -   | +                                        | -    |
| /++/ Speci-<br>fická akti-<br>vita imobil.<br>invertázy na<br>nosičích<br>/j/mg vlhké<br>hmoty/ | 16,2                                          | 19,8 | 3,6                                      | 2,8 | 14,1                                     | 22,0 |
|                                                                                                 | 8,2                                           | 19,6 | 2,4                                      | 3,9 | 1,1                                      | 1,7  |



- /a/ Předmětný způsob aktivace nosičů pomocí RRP
- /b/ Kontrolní způsob aktivace nosičů vycházející z čs. AO 214 096
- /+/ Promytí odsátých částic nosičů po aktivaci
- /-/ Nepromytí odsátých částic nosičů po aktivaci
- /++/ Uvedeno v příkladu 3

P Ř E D M Ě T   V Y N Á L E Z U

234 059

1. Způsob imobilizace mikrobiálních buněk, rostlinných buněk a enzymů, vyznačující se tím, že částice ve vodě nerozpustných organických polymerů, zejména na bázi polyethylentereftalátu, poly-/2,6-dimethyl/fenyloxydu, poly-6-kaprolaktamu, blokového kopolymeru poly-6-kaprolaktamu s polyethylenoxidem, kopolymeru vinylchloridu s vinylacetátem, polykondensátů melaminu s formaldehydem a močoviny s formaldehydem a anorganických polymerů, zejména na bázi polymerního oxidu křemičitého se zaktivují s chemicky reaktivními ve vodě rozpustnými polymery, které se připraví reakcí mezi ve vodě rozpustnými látkami obsahujícími nejméně 2 primární a/nebo sekundární aminoskupiny, zejména na větveném polyethyleniminem o molekulové hmotnosti 50 000 až 1 000 000, popřípadě polylysinem o molekulové hmotnosti 1 000 až 50 000, lysinem nebo hexamethyldiaminem a bifunkčními aldehydy dikarboxylových kyselin, jako je například glutaraldehyd, načež se k aktivovaným částicím nerozpustných polymerních materiálů přidá vodná nebo pufrovaná vodná suspenze celých mikrobiálních nebo rostlinných enzymově aktivních buněk a/nebo vodný nebo pufrovaný vodný roztok enzymu, a vzniklý imobilizovaný biokatalyzátor se separuje a promyje.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se k imobilizaci buněk a enzymů použije ve vodě nerozpustných částic organických a anorganických polymerů o velikosti 0,001 až 5 mm, specifickém povrchu od 1 do 700 m<sup>2</sup>/g a porositě částic od 0,01 do 2,5 cm<sup>3</sup>/g.
3. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že se aktivace ve vodě nerozpustných částic polymeru zejména na bázi polyethylentereftalátu, poly-/2,6-dimethyl/fenyloxydu, blokového kopolymeru vinylchloridu s vinylacetátem a polymerního oxidu křemičitého provádí jejich smíšením s předem připravenými reaktivními rozpustnými polymery, které se připraví reakcí ve vodě rozpustných látek obsahujících nejméně dvě primární a/nebo sekundární aminoskupiny s bifunkčními aldehydy dikarboxy-

lových kyselin, načež se po odstranění přebytku roztoku reaktivních polymerů vystaví kontaktu s buněčnou suspenzí či roztokem enzymu.

4. Způsob podle bodů 1 až 2, vyznačující se tím, že se částice polymerů na bázi poly-6-kaprolaktamu, blokového kopolymeru poly-6-kaprolaktamu s polyethylenoxidem a polykondenzátů melaminu s formaldehydem a močoviny s formaldehydem uvádí do kontaktu s jednotlivými reakčními složkami reaktivních rozpustných polymerů postupně, přičemž v první fázi se částice uvedených polymerů vystaví kontaktu s roztokem polyethyleniminu, polylysinu, lysinu nebo hexamethyldiaminu a po sorpci těchto látek a po odstranění přebytečného roztoku se tyto částice vystaví účinku bifunkčního aldehydu dikarboxylových kyselin, například glutaraldehydu, načež se po vytvoření reaktivního polymeru na povrchu částic přebytečný roztok opět odstraní a uvedené aktivované polymerní částice se vystaví kontaktu s buněčnou suspenzí, či roztokem enzymu.
5. Způsob podle bodů 1 až 4, vyznačující se tím, že se imobilizují celé, neporušené, enzymově aktivní buňky mikroorganismů, zejména gramnegativní a grampozitivní bakterie, acidoresistentní bakterie, aktinomycety, kvasinky a další imperfektní houby, enzymově aktivní rostlinné buňky a enzymy mikrobiálního, rostlinného či živočišného původu.