



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

208931

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 D 13/10

(22) Přihlášeno 19 01 78

(21) (PV 376-78)

(40) Zveřejněno 30 01 81

(45) Vydáno 01 11 82

(75)

Autor vynálezu

VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc.,
BÁRTA MIROSLAV RNDr.,
ZEMAN ROMAN RNDr.,
ČULÍK KAREL RNDr.,
KÁLAL JAROSLAV prof. ing. DrSc.,
DROBNÍK JAROSLAV doc. RNDr. CSc., PRAHA a
ŠVEC FRANTIŠEK ing. CSc., KLDNO

(54) **Imobilizovaná penicilinacyláza k přeměně penicilinů na kyselinu 6-aminopenicilánovou a způsob její přípravy**

Vynález se týká imobilizované penicilinacylázy ve formě ve vodě nerozpustného preparátu s penicilinacylázovou aktivitou, který slouží jako katalyzátor při přeměně penicilinů, zejména benzylpenicilinu na kyselinu 6-aminopenicilánovou (dále jen 6-APK) a způsobu jeho přípravy. Preparát je tvořen enzymem penicilinacylázou svázaným prostřednictvím polyfunkčních aldehydů s buňkami prokaryontních nebo eukaryontních organismů anebo jejich agregáty nebo fragmenty. 6-APK je surovina pro výrobu polosyntetických penicilinů a připravuje se hydrolyzou přirozených penicilinů, zejména benzylpenicilinu, kterou lze katalyzovat buď enzymem penicilinacylázou nebo čistě chemicky. Enzymovou katalýzu lze provádět rozpustnou nebo imobilizovanou penicilinacylázou a nativními, chemicky stabilizovanými, nebo imobilizovanými enzymově aktivními buňkami. Práce s imobilizovanými enzymy nebo buňkami umožňuje mnohonásobné použití katalyzátorů a dosažení vyšších výtěžků a vyšší kvality 6-APK.

V posledních 10-ti letech bylo přihlášeno k patentové ochraně zhruba 30 postupů imobilizace penicilinacylázy, které lze v podstatě rozdělit na fyzikální (uzavření v síti polymeru, mikroenkapsu-

lace, adsorpce) a chemické (kovalentní nebo iontová vazba mezi enzymem a nosičem, zesílení enzymu bez použití nosiče).

Do první skupiny patří postup imobilizace penicilinacylázy, např. fyzikálním uzavřením enzymu do vláken triacetátu celulózy nebo nitrocelulózy, který je popsán ve francouzském patentovém spisu č. 2.222.383 a italském patentovém spisu č. 836.462. Chemický způsob imobilizace tohoto enzymu na nejrůznější nerozpustné umělé materiály je popsán např. v čs. patentovém spisu č. 145.849, NSR spisech DOS 1.917.057, DOS 2.157.970, DOS 2.157.972, DOS 2.355.078, britských patentových spisech GB 1.193.918, GB 1.357.317, GB 1.400.468, na ve vodě rozpustné polymery např. v NSR patentových spisech DOS 2.312.824 a DOS 2.535.951. Zachycení penicilinacylázy v síti anorganického polymeru a následné kovalentní zesílení enzymu je popsáno např. v SSSR patentovém spisu č. 530.885.

Většina patentovaných postupů kryje způsob imobilizace penicilinacylázy na nejrůznějších přirozených nebo syntetických organických polymelech nebo anorganických nosičích a využívá přitom z hlediska chemického, často velmi podobných

nebo stejných metod imobilizace. Snahou, resp. cílem uvedených a dalších postupů je neustále ekonomizovat výrobu 6-APK a tím i polosyntetických penicilinů a cefalosporinů, přičemž využití imobilizovaného preparátu penicilinacylázy je limitováno především cenou a dostupností nosiče, jednoduchostí techniky imobilizace, mechanickou stabilitou preparátu, zachycenou specifickou aktivitou (účinností) a v neposlední řadě i stabilitou zachycené enzymové aktivity, při dlouhodobém opakovaném použití, neboť jen přibližně 200-násobně opakované použití imobilizovaného enzymu ve srovnání např. s jednorázovým použitím nativních buněk s penicilinacylázovou aktivitou pro výrobu 6-APK, přináší vyšší efektivnost a kryje náklady na izolaci enzymu, cenu nosiče a technologii imobilizace.

Čs. farmaceutická firma SPOFA ve spolupráci s ČSAV volila specifickou cestu a vyvinula některé původní postupy ve vztahu k výrobě 6-APK a předmětnému vynálezu, avšak použitím chemicky imobilizovaných mutantních buněk s vysokým obsahem penicilinacylázy. Jedná se o semikontinuální způsob výroby 6-APK podle čs. autorského osvědčení č. 201621, dále o způsob imobilizace těchto buněk na povrch některých syntetických polymerů podle čs. autorského osvědčení č. 200802 a konečně o způsob výroby 6-APK pomocí kovalentně vázaných produkčních buněk navzájem nebo těchto buněk vázaných na jiné buňky různých organismů majících charakter nerozpustného nosiče, tj. tvorbu mikrobiálních agregátů tvořících chemicky zesítné, dobře sedimentující, integrální jednotky s vysokým obsahem zachycené enzymové aktivity, podle čs. autorského osvědčení č. 197101

Ve vztahu k předmětnému vynálezu, kromě citovaných čs. vynálezů, existuje rovněž několik literárních údajů týkajících se imobilizace enzymů na buněčné povrchy. Je to především práce Hougha a Lyonse [Nature 235, 389 (1972)] popisující vazbu enzymu amyloglukosidázy na povrch pivovarských kvasinek prostřednictvím $TiCl_3$ nebo $TiCl_4$. Autoři rovněž uvádějí, že jako vazných činidel lze použít solí železa a cínu. Kromě amyloglukosidázy byla těmito autory popsána imobilizace bakteriální alfa-amylázy a trypsinu na povrchy buněk *Bacillus subtilis* a *Escherichia coli*. Imobilizace amyloglukosidázy na povrch kvasinek umožňuje přímé využití dextrinů pro kvasné procesy, což má význam při výrobě piva, whisky, ethanolu, octa apod. Takasaki [Agr. Biol. Chem. 38, 1061 (1974)] popsal kovalentní vazbu beta-amylázy, invertázy, trypsinu a katalázy na povrch mikrobiálních buněk, zejména *Streptomyces* sp., *Aspergillus niger* a *oryzae*, pomocí toluendiisokyanátu. Konečně Pace a sp. (v Insolubilized Enzymes, edit. M. Salmona, C. Saronia a S. Garattini, Raven Press, New York, pp. 157–164, 1974) popisují kovalentní vazbu glukosooxidázy na povrch intaktních lidských erythrocytů pomocí vícefunkčních činidel (kyanurchlorid, bis-diazobenzidin, glutar-

dialdehyd, $TiCl_4$) ve vztahu k využití tohoto imobilizovaného enzymu v humánní medicíně, při některých metabolických defektech a patologických stavech. Broun [v Methods in Enzymology 44, 263 (1976)] popisuje několik technik imobilizace enzymů jejich chemickou agregací bi- nebo polyfunkčními činidly. Společným nedostatkem těchto materiálů jsou však jejich špatné mechanické vlastnosti.

Podobný postup pro imobilizaci řady enzymů včetně penicilinacylázy je použit ve francouzském patentovém spisu č. 2.195.953, podle něž lze k vyztužení preparátů použít inertní materiály vybrané ze skupiny látek zahrnující infusoriové hlinky, expandovaný perlit, vláknité a práškovité celulosy, dřevěné piliny, plst, chlupy, písek a syntetické materiály na bázi polyamidů, polyesterů, polyurethanu, polypropylenu, acetátů celulosy anebo silikonů. Podle francouzského patentového spisu č. 2.195.954 lze mechanickou i enzymovou stabilitu takto imobilizovaných enzymů zlepšit přidáním nebiřkoviných pojidel a to polyaminů a alginátu.

Zjistili jsme nyní, že pro imobilizaci penicilinacylázy lze použít celých neporušených nativních anebo fyzikálně, chemicky nebo biochemicky ošetřených buněk mikroorganismů, jejich přirozených nebo uměle vytvořených agregátů, nerozpustných fragmentů, popřípadě jejich směsí.

Materiál buněčných povrchů obsahuje řadu skupin schopných reakce s polyfunkčními činidly, např. glutardialdehydem, jejichž prostřednictvím lze dosáhnout jak vazby enzymu na buňky, tak i vazby buněk navzájem. Navíc samotnou polysacharidovou kostru, která uděluje buněčným stěnám pevnost a pružnost a která obsahuje aminoskupiny reagující buď přímo nebo po ošetření, např. deacetylaci, s glutardialdehydem, lze snadno aktivovat pro vazbu bílkovin např. působením oxidačních činidel jako je jodistan sodný a tím zvýšit počet reaktivních míst.

Prostřednictvím polyfunkčních činidel lze proto imobilizovat penicilinacylázu na povrchy celých neporušených nativních anebo fyzikálně, chemicky nebo biochemicky ošetřených buněk prokaryontních nebo eukaryontních organismů či jejich nerozpustných fragmentů. Těchto materiálů lze rovněž použít ke zpevnění struktury penicilinacylázy kovalentně zesítné polyfunkčními činidly, např. glutardialdehydem. Zpevnění struktury zesítného enzymu je dosaženo jak tehdy, jsou-li použity buňky ve formě relativně pevných porézních struktur jako v případě mikrobiálních pelet, nebo uměle připravených agregátů, tak i tehdy, dochází-li k tvorbě těchto struktur současně s agregací bílkovin. V posledním případě je zvláště výhodné použití buněk vláknitého tvaru. Ve všech případech je pak materiál tvořen dvěma porézními strukturami, které jsou navzájem kovalentně spojeny. Jednotlivé buňky nebo jejich nerozpustné fragmenty však lze použít ke zpevnění struktury kovalentně zesítné penicilinacylázy i tehdy, ne-

tvorí-li samostatnou kontinuální fázi. Výsledný materiál je pevný, ve vodě nerozpustný, s dobrými sedimentačními vlastnostmi, vysokým stupněm zachycené enzymové aktivity a dobrou stabilitou této aktivity.

Velikost imobilizovaných částic, jejich sedimentační vlastnosti a stupeň zachycené enzymové aktivity jsou řízeny hmotnostním poměrem nosiče (též jeho kvalitou resp. mikrobiálním druhem-kmenem a způsobem ošetření) a penicilinacylázy, reakční teplotou, hodnotou pH reakční směsi a použitou technikou zesílení polyfunkčním aldehydem zahrnujícím stání, míchání o různé intenzitě, mražení a následné pomalé rozmrazování, sušení nebo kombinací těchto technik. Z hlediska mechanické pevnosti a pružnosti je významná přítomnost izolovaných buněčných stěn nebo jejich fragmentů z některých bakterií, zvláště buněčných stěn gram pozitivních bakterií obsahujících vysoké množství muerinu; fragmenty těchto buněčných stěn fungují jako pojivo a vstupují do reakce.

Předmětem vynálezu je imobilizovaná penicilinacyláza k přeměně penicilinů, zejména benzylpenicilinu na kyselinu 6-aminopenicilánovou, vyznačená tím, že sestává z enzymu penicilinacylázy a buněk nebo buněčných fragmentů prokaryontních nebo eukaryontních organismů vázaných navzájem chemicky prostřednictvím polyfunkčních aldehydů, s výhodou glutardialdehydu.

Při výrobě imobilizované penicilinacylázy podle vynálezu se postupuje tak, že enzym penicilinacyláza se nechá reagovat s celými neporušenými nativními anebo fyzikálně, chemicky nebo biochemicky ošetřenými buňkami či nerozpustnými fragmenty buněk různé morfologie a s polyfunkčním aldehydem, s výhodou glutardialdehydem.

Při výrobě imobilizované penicilinacylázy podle vynálezu se použije rozpustného enzymu penicilinacylázy, který popřípadě obsahuje jiné bílkoviny provázející jej v průběhu izolace. Dále je možné při výrobě imobilizované penicilinacylázy podle vynálezu postupovat tak, že k reakci s enzymem a polyfunkčním aldehydem se použije nerozpustných fragmentů nebo celých buněčných stěn organismů, s výhodou gram pozitivních bakterií.

Dále při výrobě imobilizované penicilinacylázy podle vynálezu je možné postupovat také tak, že k reakci s enzymem a polyfunkčním aldehydem se použije fragmentů nebo částečně uměle či samovolně lyzovaných buněk mikroorganismů produkujících penicilinacylázu.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob přípravy imobilizované penicilinacylázy, vyznačený tím, že k reakci s enzymem a polyfunkčním aldehydem se použije odpadních buněk, odpadní buněčné hmoty nebo fragmentů z nich připravených nebo samovolně vzniklých.

Dále je způsob přípravy imobilizované penicilinacylázy ke štěpení penicilinu podle vynálezu, vyznačený tím, že se použije polyfunkčního aldehydu v množství 0,1 až 10 % hmotnostních (w/v).

Postup podle našeho vynálezu má značné ekonomické a další výhody, a to v tom, že cena nosiče a pojiva je prakticky nulová, technika imobilizace je jednoduchá, bez předchozí chemické aktivace, počet technologických stupňů přípravy imobilizovaného preparátu je minimální, a v možnosti přípravy imobilizovaného preparátu penicilinacylázy s vysokou specifickou aktivitou.

Výhodou je dále to, že je možná imobilizace penicilinacylázy na enzymově aktivní nosiče, tj. vazba na vysokoprodukční mutantní buňky-fortifikované preparáty a že je možné použití technických preparátů penicilinacylázy, přičemž enzym není nutno složitě čistit nákladnými a ztrátovými postupy. Výhodná je také možnost dlouhodobého opakovaného použití v poměrně širokém rozmezí volby technologie enzymové hydrolyzy, resp. typu reaktoru. Připravené imobilizované preparáty mají dobré sedimentační a mechanické vlastnosti, pružnost a pevnost a dobrou stabilitu enzymové aktivity. Dalšími výhodami jsou enzymová hydrolyza do vysokého stupně konverze (více jak 90 %) s možností hydrolyzy poměrně vysokých koncentrací penicilinu, možnost použití postupů izolace 6-APK z reakční směsi poskytující vysoké výtěžky, dobrá rozpustnost 6-APK a její vysoká kvalita, nízký obsah bílkovinných příměsí a tím možnost přípravy hypoalergenních polosyntetických penicilinů.

Oproti dříve známému postupu spočívajícímu v imobilizaci celých buněk na nosič, který je rovněž buněčného původu je tento způsob výrazně jednodušší, nevyžaduje použití flokulačních činidel ani použití organických rozpouštědel či dalších postupů ke konečné úpravě vlastností preparátu. Princip podle našeho vynálezu využívá výhodných chemických vlastností samotného technického enzymu, který je principiálně také polyfunkčním činidlem a současně i aktivní látkou. Navíc tato metoda poskytuje vyšší výtěžky zachycené aktivity a dává preparáty s absolutně vyšší specifickou aktivitou enzymu.

Jako zdroje pro přípravu technické penicilinacylázy i jako nosiče pro přípravu imobilizovaných fortifikovaných preparátů penicilinacylázy podle vynálezu bylo použito hyperprodukční mutanty *Escherichia coli* CCM 2843; kmen byl získán genetickou manipulací postupem podle čs. autorského osvědčení č. 162.274 a je chráněn podle čs. autorského osvědčení č. 188631. Technická penicilinacyláza z uvedeného kmene byla připravena klasickým způsobem, tj. mechanickou desintegrací zahuštěné buněčné suspenze, okyselením, odstředěním buněčného detritu, frakčním srážením síranem amonným, dialýzou a lyofilizací. Naznačeným způsobem byly získány dva technické preparáty penicilinacylázy v pevném (lyofilizovaném) stavu. Preparát (1) měl specifickou aktivitu 300 j/mg, preparát (2) 544 j/mg bílkovin.

Aktivita penicilinacylázy byla hodnocena spektrofotometricky barevnou reakcí p-dimethylaminobenzaldehydu s 6-APK podle čs. patentu č. 116959 v modifikaci podle Balasinghama a sp.

[Biochim. Biophys. Acta 276, 250 (1972)] při 42 °C a hodnotě pH 7,6 v oblasti reakční kinetiky nultého řádu. Jednotka enzymové aktivity je takové množství enzymu, které katalyzuje vznik jednoho umolu 6-APK z benzylpenicilinu, resp. jeho soli za hodinu. Specifická aktivita volného (nativního) enzymu je vyjádřena jako μmol 6-APK/h/mg bílkovin. Koncentrace bílkovin byla hodnocena spektrofotometricky podle Lowryho a sp. [J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)]. Specifická aktivita imobilizované penicilinacylázy je vyjádřena jako μmol 6-APK/h/mg vlhké (dobře odsáté) hmoty ve vodě nerozpustného preparátu.

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

Příklad 1

Buněčná pasta *E. coli* obsahující penicilinacylázu byla suspendována ve vodě na koncentraci 400 mg vlhké hmoty/ml a tato suspenze byla desintegrována čtyřnásobnou recyklací na mechanickém desintegrátoru Manton-Gaulin při tlaku 33,3 MPa při laboratorní teplotě. Homogenát byl odstředěn (5000 G/1 h). 10 g vlhké hmoty fragmentů *E. coli* bylo ve směsi s 20 g vlhké hmoty neporušených buněk *E. coli* téhož kmene obsahujících penicilinacylázu suspendováno ve vodě na výsledný objem 200 ml. Hodnota pH suspenze byla upravena 25%ním roztokem NaOH na 7,5 a suspenze byla po smíšení s 16 ml 25%ního roztoku glutardialdehydu vpravena do 500 ml varné baňky a umístěna na rotační třepací stroj. Reakce probíhala za míchání (240 t/min) 3 hodiny při teplotě 26 °C. Potom byla reakční směs zředěna 100 ml vody a odstředěna (500 G, 5 min.), sediment promyt 250 ml a znovu odstředěn (5000 G, 15 min). K 10 g vlhké hmoty popsaným způsobem získaných mikrobiálních agregátů o jejich specifické aktivitě 3,6 j/mg vlhké hmoty preparátu byl přidán 1 g technické lyofilizované penicilinacylázy o specifické aktivitě 544 j/mg bílkovin. Směs byla doplněna do 100 ml 0,05 M fosfátovým pufrům o pH 7,6 (podle Sørensen) a homogenizována ocelovým laboratorním vrtulovým míchadlem 10 min. Po mírném poklesu pH na hodnotu 7,2 bylo pH suspenze upraveno 25%ním roztokem NaOH opět na hodnotu 7,6, přidáno 4 ml 25%ního roztoku glutardialdehydu, krátce a rychle zamícháno a reakční směs byla přelita do 500 ml varné baňky a umístěna na rotační třepací stroj. Reakce probíhala 3 hodiny při teplotě 26 °C za míchání (240 ot/min). Po této době byla reakční směs zfiltrována přes silonovou tkaninu o velikosti ok 75 × 75 μm a získané agregáty byly 3krát na tkanině promyty 100 ml destilované vody a odsáty na širokopórním filtračním papíře do formy tuhé vlhké pasty.

Takto byl získán preparát enzymu penicilinacylázy imobilizované na enzymově aktivní mikrobiální buněčné agregáty v množství 20,8 g o specifické aktivitě 17,62 j/mg vlhké hmoty při výtěžku z celkové počáteční enzymové aktivity 63,0 %.

Příklad 2

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

Z 25,0 g této vlhké pasty a 70 g vlhké pasty buněk *E. coli* obsahujících penicilinacylázu bylo připraveno 500 ml homogenní suspenze v 0,05 M fosfátovém pufru pH 7,6 (podle Sørensen); pH homogenní suspenze bylo po nepatrném poklesu upraveno 25%ním roztokem NaOH na hodnotu 7,6. K míchané homogenní suspenzi bylo přidáno 20 ml 25%ního roztoku glutardialdehydu. Reakce probíhala za mírného míchání laboratorním míchadlem 5 hodin při teplotě 25 °C. Potom byla reakční směs zředěna 5 l vody a odstředěna (500 G, 5 min), sediment promyt 2,5 l vody a znovu odstředěn (5000 G, 15 min).

K 10 g vlhké hmoty popsaným způsobem získaných mikrobiálních agregátů o jejich specifické aktivitě 3,24 j/mg vlhké hmoty preparátu byl přidán 1 g technické lyofilizované penicilinacylázy o specifické aktivitě 544 j/mg bílkovin. Směs byla doplněna do 100 ml 0,05 M fosfátovým pufrům o pH 7,6 (dle Sørensen) a homogenizována. Dále bylo postupováno jak je uvedeno v příkladu 1; takto byl získán preparát enzymu penicilinacylázy imobilizované na enzymově aktivní mikrobiální buněčné agregáty v množství 15,5 g o specifické aktivitě 13,12 j/mg vlhké hmoty při výtěžku z počáteční enzymové aktivity 34,9 %.

Příklad 3

Přibližně 100 g odpadního buněčného materiálu *Aspergillus oryzae* po výrobě alfa-amylázy bylo důkladně promyto vodou na sítu s velikostí ok 0,5 mm a sítím zadržené kuličkové mycelium (pelety) bylo rozmícháno v acetonu, odfiltrováno a usušeno volně na vzduchu.

Suché pelety v množství 1 g byly ponechány bobtnat v 50 ml roztoku technické penicilinacylázy o koncentraci 2,5 mg/ml v 0,05 M fosfátovém pufru o pH 6,5 podle Sørensen (specifická aktivita 544 j/mg bílkovin). Po 30ti minutách byly za stálého míchání přidány 2 ml 25%ního roztoku glutardialdehydu; reakce probíhala za nepřetržitého míchání laboratorním míchadlem při laboratorní teplotě 3 hodiny. Potom byl obsah nádoby zfiltrován přes výše uvedené síto, promyt třikrát 100 ml destilované vody a pelety suspendovány ve 100 ml 2 N NaCl. Po 18 hodinách stání při +8 °C byl materiál oddělen pomocí stejného síta, promyt třikrát 100 ml destilované vody a zbaven nadbytečné vody vakuovou filtrací.

Takto získaný imobilizovaný enzym vykazoval specifickou aktivitu 8,25 j/mg vlhké hmoty a obsahoval 60 % výchozí enzymové aktivity.

Příklad 4

Submerzní kultivací asporogenního kmene *Ba-*

cillus megatherium CCM 2037 ve 150 l fermentačním tanku při teplotě v rozmezí 40 až 48 °C v přítomnosti vysokých koncentrací aminokyselin (ve formě kukuřičného extraktu) postupem podle J. Chaloupky a sp., [Biotechnol. and Bioeng. Symp. No. 4, 985 až 993 (1974)] a s přidavkem chloramfenikolu v množství 50 µg/ml na konci exponenciální fáze růstu, bylo získáno přibližně 3000 g buněčné hmoty. Tímto způsobem bylo dosaženo tvorby velmi dlouhých vláken uvedeného kmene s vysokým obsahem mureinu (peptidoglykanu) v buněčné stěně.

Popsaným způsobem získaná nativní buněčná hmota B. megatherium byla rozdělena do dvou dílů à 1500 g vlhké hmoty. První díl nativní buněčné hmoty byl suspendován v 1500 ml vody a za míchání zahřát na 64 °C a přidáno 3000 ml 10%ní (w/v) kyseliny trichloroctové předeřháté na 62 °C. Směs byla za míchání ohřata na 80 °C a při této teplotě zahřívána 20 minut. Potom byla směs ochlazená na 30 °C, odstředěna a buněčná hmota promyta 20 l vody. Takto bylo získáno 800 g vlhké buněčné hmoty ošetřených vláken B. megatherium kyselinou trichloroctovou; velikost vláken se pohybovala v rozmezí 20 až 30 µm.

Část nativní a část trichloroctovou kyselinou ošetřené buněčné hmoty B. megatherium byla rozmíchána ve vodě na koncentraci 30 g vlhké hmoty/100 ml a buňky byly desintegrovány šestnásobnou recyklací na mechanickém desintegrátoru Manton-Gaulin při tlaku 500 kp/cm² při laboratorní teplotě. Fragменты buněčných stěn byly odděleny odstředěním 30 minut při 20 000 G a pětkrát promyty destilovanou vodou.

Fragменты buněk ošetřených trichloroctovou kyselinou byly rozmíchány ve vodě, pH upraveno 20%ním roztokem NaOH na hodnotu 11,0 a suspenze míchána 20 hodin při 25 °C a potom byla znovu odstředěna a fragменты buněčných stěn promyty několikrát vodou. Technická penicilínacyláza (specifická aktivita 544 j/mg bílkovin) byla rozpuštěna v 0,05 M fosfátovém pufru o pH 7,6 dle Sørensenova na výslednou koncentraci 40 mg/ml a ve 25 ml tohoto roztoku bylo suspendováno vždy po 1 g vlhké hmoty, nativních nebo ošetřených celých buněk B. megatherium či nativních nebo ošetřených fragментů buněčných stěn tohoto kmene takto:

(A) fragменты nativních buněk, (B) fragменты buněk ošetřených trichloroctovou kyselinou a NaOH, (C) celé nativní buňky, (D) celé buňky ošetřené trichloroctovou kyselinou. Za stálého míchání bylo ke každé ze suspenzí přidáno 1 ml 25%ního roztoku glutardialdehydu; reakce probíhala 30 minut při laboratorní teplotě za stálého míchání a 30 minut nebyla reakční směs míchána za jinak stejných podmínek. Po 60 minutách reakce byly vzniklé agregáty odděleny na sítu s velikostí ok 75 µm, promyty třikrát 100 ml destilované vody a zřaveny nadbytečné vody vakuovou filtrací.

Specifická aktivita a výtěžek imobilizovaného enzymu jsou uvedeny v následující tabulce, při-

čemž jako kontrolní preparát sloužily agregáty připravené pouze z roztoku enzymu.

Imobilizovaný preparát	Specifická aktivita (j/mg vlhké hmoty)	Výtěžek (%)
Kontrolní preparát	19,5	45,4
A	17,1	44,7
B	18,0	45
C	15,6	43,8
D	20,1	48,6

2 g z každého materiálu byly přeneseny do 500 ml varné baňky, suspendovány ve 100 ml 0,05 M fosfátového pufru podle Sørensenova o pH 7,6 a umístěny na rotační třepací stroj (240 ot/min, výstředník 6,5 cm, teplota 29 °C). Po 8 (192 hodin) a 22 (528 hodin) dnech byly imobilizované preparáty odděleny filtrací přes uvedené síto a stanovena jejich enzymová aktivita, potom opět promyty a znovu suspendovány do téhož objemu stejného pufru a umístěny opět na rotační třepací stroj.

Změny enzymové aktivity imobilizované penicilínacylázy uvedených preparátů při dlouhodobém testování stability jsou uvedeny v následující tabulce:

Imobilizovaný preparát	Enzymová aktivita (%)		
	0 hodin	192 hodin	528 hodin
Kontrolní preparát	100	73,1	39
A	100	79,2	58,3
B	100	83,5	70,3
C	100	93,5	74,8
D	100	91,6	96,4

Příklad 5

Ve 100 ml 0,05 M fosfátového pufru dle Sørensenova o pH 7,6 bylo suspendováno 4 g vlhké hmoty celých buněk B. megatherium ošetřených trichloroctovou kyselinou způsobem podle příkladu 4. V této suspenzi byly rozpuštěny 3 g technické penicilínacylázy o specifické aktivitě 300 j/mg bílkovin. Za stálého míchání laboratorním míchadlem byly přidány 4 ml 25%ního roztoku glutardialdehydu a agregáty vzniklé po 30 minutách míchání byly ponechány stát dalších 30 minut. Reakce probíhala při laboratorní teplotě. Po 60 minutách byly pelety odděleny filtrací na sítu s velikostí ok 75 µm, promyty třikrát 400 ml destilované vody, rozmíchány ve 100 ml acetonu ochlazeného na -15 °C a po 5ti minutovém míchání ostře odsáty na fritě G1 a sušeny prosáváním vzduchem.

Aktivita takto získaného ve vodě nerozpustného materiálu byla 18 j/mg vlhké hmoty a výtěžek aktivity činil 22 %. Kontrolní materiál byl připraven tímto způsobem z roztoku téhož enzymu (agregované bílkoviny bez peptidoglykanu). Enzy-

mová aktivita kontrolního materiálu byla 30 j/mg vlhké hmoty při výtěžku 27 %. 2 g nerozpustného materiálu byly použity pro opakovanou enzymovou hydrolýzu 7%ního vodného roztoku sodné soli benzylpenicilinu v objemu 80 ml při teplotě 37 °C a udržování pH (pH-stat) dávkováním čpavkové vody v rozmezí hodnot 7,6 až 7,8. Reakční doba byla 90 minut.

Opakované konverze benzylpenicilinu na 6-APK pomocí imobilizované penicilinacylázy na peptidoglykanové pelety a srovnání s kontrolním materiálem (zesítěně bílkoviny), za podmínek uvedených výše je uvedeno v následující tabulce:

konverze	kontrolní materiál	pelety
1	95,0 %	91,0 %
2	88,5 %	94,4 %
3	84,8 %	91,1 %
4	81,6 %	94,8 %
5	—	91,9 %
6	—	91,5 %
7	—	92,3 %

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Imobilizovaná penicilinacyláza k přeměně penicilinů, na kyselinu 6-aminopenicilánovou, vyznačená tím, že sestává z enzymu penicilinacylázy a buněk nebo buněčných fragmentů prokaryontních nebo eukaryontních organismů svázaných navzájem chemicky prostřednictvím polyfunkčních aldehydů, s výhodou glutardialdehydu.

2. Způsob přípravy imobilizované penicilinacylázy podle bodu 1, vyznačený tím, že se enzym penicilinacyláza nechá reagovat s celými neporušenými nativními anebo fyzikálně, chemicky nebo biochemicky ošetřenými buňkami nebo nerozpustnými fragmenty buněk různé morfologie a s polyfunkčním aldehydem, s výhodou glutardialdehydem.

3. Způsob podle bodu 2, vyznačený tím, že se použije rozpustné penicilinacylázy, která obsahuje popřípadě jiné bílkoviny provázející ji v průběhu izolace.

4. Způsob podle bodů 2 a 3, vyznačený tím, že k reakci s enzymem a polyfunkčním aldehydem se použije fragmentů nebo celých buněčných stěn mikroorganismů, s výhodou gram pozitivních bakterií.

5. Způsob podle bodů 2 a 3, vyznačený tím, že k reakci s enzymem a polyfunkčním aldehydem se použije fragmentů nebo částečně uměle nebo samovolně lyzovaných buněk mikroorganismů produkujících penicilinacylázu.

6. Způsob podle bodů 2, 3 a 4, vyznačený tím, že k reakci s enzymem a polyfunkčním aldehydem se použije odpadních buněk, odpadní buněčné hmoty nebo fragmentů z nich připravených nebo samovolně vzniklých.

7. Způsob podle bodů 2 až 6, vyznačený tím, že se použije polyfunkčního aldehydu v množství 0,1 až 10 % hmotnostních.