



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

248 535

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 24 07 85
(21) PV 5458-85

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 11/02

(40) Zveřejněno 12 06 86
(45) Vydáno 01 07 88

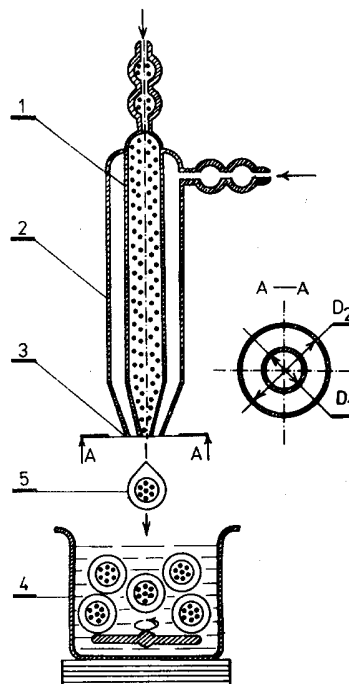
(75)
Autor vynálezu

MACHEK FRANTIŠEK ing. CSc., VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc.,
UJCOVÁ EMMA RNDr. CSc., HASAL PAVEL ing. CSc.,
LUDVÍK JIŘÍ RNDr. CSc., KRUMPHANZL VLADIMÍR člen korespondent ČSAV,
SLAVÍČEK FRANTIŠEK ing., PRAHA

(54)

Způsob fyzikální imobilizace živých buněk do vrstvených
pelet a zařízení k provádění tohoto způsobu

Řešení se týká fyzikálního způsobu imobilizace živých buněk do dvou resp. vícevrstevných pelet a zařízení k provádění tohoto způsobu, přičemž imobilizované buňky v těchto peletách jsou využitelné k průmyslovým biotransformacím, resp. biokonverším, zejména pro kvasné a biosyntetické procesy. Podstata řešení spočívá v tom, že se suspenze nativních buněk prokaryotních nebo eukaryotních mikroorganismů vmíchá do vodných gelů připravených z přírodních materiálů na bázi thermoreversibilních gelů nebo iontově reversibilních polysacharidů, načež se tato směs vytlačuje středem víceproudé koaxiální trysky, přičemž ústími trysky se společně vytlačuje gelový materiál bez buněk a vytvořené vrstvenné kapky se vkapávají do vody nebo roztoků anorganických nebo organických solí a po jejich ztuhnutí a/nebo vytvrzení se vrstvené pelety oddělí a případně dále zpevňují. Řešení je dále specifikováno poměry rychlostí vytlačování gelů obsahujících buňky a gelů samotných, které se nejvýhodněji pohybují v poměru 0,5 : 1. Součástí řešení je též zařízení k provádění způsobu, které sestává z centrální komory, alespoň jedné koncentrické komory ústící do víceproudé koaxiální trysky.



Vynález se týká fyzikálního způsobu imobilizace živých buněk do vrstvených pelet a zařízení k provádění tohoto způsobu, přičemž imobilizované buňky v těchto peletách jsou využitelné k průmyslovým biotransformacím, resp. biokonverzím, zvláště pak pro kvasné a biosyntetické výroby.

Určitým pokrokem v oblasti enzymového inženýrství, resp. enzymové biotechnologie, je imobilizace enzymů nebo enzymově aktivních buněk. V prvním případě je enzym získaný procesem izolace z produkčních buněk fixován, resp. upoután /zakontven/, určitými specifickými způsoby, obvykle vazbou na, resp. do částic, ve vodě rozpustného materiálu - nosiče. V druhém případě jsou různými způsoby enzymy "konzervovány", resp. fixovány, přímo v individuálních buňkách, bez nebo za tvorby dobře sedimentujících částic imobilizovaných buněk. Jak imobilizované enzymy, tak imobilizované buňky je pak možné průmyslově využívat mnohonásobně opakovaně, resp. kontinuálně, s cílem přípravy požadovaných průmyslově významných produktů enzymové přeměny.

Použití imobilizovaných buněk má oproti imobilizovaným enzymům řadu výhod. Nejsou to jen výhody ekonomické, v procesu výroby buněčných katalyzátorů odpadá nákladná izolace enzymů, ale i výhody další, především využití dvou, tří resp. multienzymových katalýz vedoucích k tvorbě požadovaných produktů. V tomto smyslu je použití imobilizovaných buněk ve srovnání s imobilizovanými enzymy nezastupitelné.

Způsob imobilizace buněk diktuje reálnou možnost průmyslového využití buněčných biokatalyzátorů, neboť vlastnosti částic imobilizovaných buněk jsou způsobem imobilizace do značné míry předem určeny. Jedná se o vlastnosti biochemické, fyzikální, fyzikálně chemické a technologické. Pro průmyslové biotransformace a biokonverze jsou nejvíce využívány imobilizované mikrobiální buňky ve formě individuálně chemicky ošetřených a stabilizovaných buněk, nebo ve formě buněčných, chemicky stabilizovaných agregátů /např. čs. autorská osvědčení č. 201 621, 197 101, 200 802, 203 607, 209 265, 218 023, 231 458, 234 059/. V převážné většině případů jsou tyto preparáty imobilizovaných buněk tvořeny mrtvými buňkami, neschopnými růstu a množení a ve většině případů v nich neprobíhá proteosyntéza. Limitem širšího uplatnění těchto typů buněčných biokatalyzátorů je jednak citlivost některých klíčových enzymů v intaktních buňkách na chemické a fyzikální působení vedoucí k tvorbě imobilizovaných buněk, jednak určité omezení v jejich využití jen

na poměrně jednoduché enzymově katalyzované biotransformace, např. hydrolýza, izomerace, racemizace, adice, optická rezoluce.

Další skupinou buněčných biokatalyzátorů jsou imobilizované živé buňky. Od konce padesátých let je v odborné i patentové literatuře patrná snaha o vypracování šetrných způsobů imobilizace živých buněk, převážně fyzikálním způsobem, s cílem zachování celých metabolických drah katalyzovaných desítkami enzymů a vedoucích k biotransformaci substrátů na požadované, přes mnoho meziproduktů vedoucí produkty /multienzymová biodegradace, biosyntéza/. Na rozdíl od způsobů imobilizace mrtvých buněk, kde se využívá převážně metod chemických, se běžně používá šetrných fyzikálních metod, zejména zabudování buněk do termoreversibilních gelů, zvláště agaru a želatiny /např. čs. patentový spis č. 113 908 již z roku 1962/. Dále např. v obsáhlém NSR patentovém spise DOS 2 278 622 z roku 1978 jsou popsány různé techniky a kombinované fyzikální imobilizace různých živých převážně mikrobiálních buněk do různých přírodních materiálů na bázi polysacharidů, zejména alginátu, κ-carrageenanu, furcelleránu a různých dalších iontově reversibilních gelů a jejich využití pro cílené biotransformace a biokonverze, pro kvasné procesy a biosyntetické výroby.

Imobilizované živé buňky se převážně využívají v kvasném průmyslu, zejména pro výrobu ethanolu, methanolu, acetonu a butanolu, glycerolu, mléčné kyseliny, piva, vína, whisky a bioplynu /např. Immobilized Microbial Cells, K. Venkatsubramanian, ed., Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 106, str. 1-157, Washington, 1979; I. Chibata a T. Tosa, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 10, 197, 1981; Enzyme Engineering, Vol. 6, I. Chibata, S. Fukui a L. B. Wingard, Jr., eds., Plenum Press, New York and London, 1982; V. Vojtíšek a V. Jirků, Folia microbiol. 28, 309-340, 1983; J. Klein a F. Wagner, Appl. Biochem. Bioeng. 4, str. 11-49, Acad. Press, Inc., 1983/. V odborné literatuře, zatím na úrovni základního výzkumu, jsou popsány výsledky, s cílem využití imobilizovaných živých buněk pro produkci biologicky aktivních látek, zejména antibiotik, vitaminů, hormonů, alkaloidů a extracelulárních enzymů /např. v: Biotechnology of Industrial Antibiotics, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol. 22, E. J. Vandamme, ed., str. 762-780, 1984/. Z hlediska využití imobilizovaných živých buněk, zejména kvasinek, lze uvést např. aplikaci imobilizovaných buněk do alginátu při využití specifického zařízení pro výrobu vína a piva podle čs. autorských osvědčení č. 234 226 a č. 238 076.

Podle uvedených a dalších patentových a literárních údajů se při imobilizaci do thermoreversibilních gelů /např. ager, želatina/ obvykle postupuje tak, že do teplého gelu se vmíchají celé buňky obsahující požadované enzymy a směs se nechá ztuhnout při pokojové teplotě nebo se vymrazuje. Po ztuhnutí thermoreversibilních gelů se ztuhlý koláč obvykle mechanicky dále zpracovává se zřetelem na velikost a tvar částic, např. řezáním na částice různých tvarů. Pokud jde o způsob imobilizace buněk do intově reversibilních gelů na bázi polysacharidů /např. alginát, κ-carrageenan/, opět se buňky s požadovanou enzymovou aktivitou vmíchají za pokojové nebo mírně zvýšené teploty do těchto materiálů a suspenze se obvykle vkapává např. injekční stříkačkou do roztoků anorganických solí jejichž volba závisí na charakteru použitého materiálu /např. CaCl_2 , MgCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl apod./, čímž dojde k vytvrzení kapek ve formě sferických nebo vejčitých pelet /částic/ při teplotě místnosti nebo za chladu. Je pochopitelné, že distribuce individuálních buněk v popsáném způsobem získaných částicích je nerovnoměrná a část buněk v částicích je imobilizována na okraji částice případně velmi blízko směrem k povrchu pelety, takže buňky se z částic snadno uvolňují.

V citovaných a dalších pracech z odborné a patentové literatury je zřejmé, že fyzikální způsob imobilizace do thermoreversibilních přírodních materiálů a do iontově reversibilních přírodních materiálů na bázi polysacharidů je běžně znám. Nevýhodou popsáných postupů imobilizace živých buněk v uvedených a dalších materiálech je však nízká mechanická pevnost částic imobilizovaných buněk a především růst a množení buněk v částici, čímž dochází v poměrně krátké době k značnému uvolňování buněk do externího prostředí a ve svých důsledcích k rozpadu částice, zvláště při snaze o aplikaci těchto materiálů pro kvasné procesy a biosyntetické výroby. Tato skutečnost limituje širší průmyslové využití fyzikálním způsobem imobilizovaných buněk.

Výše uváděné nevýhody jsou odstraněny vypracováním způsobu podle předmětného vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se suspenze celých nativních živých buněk prokaryontních nebo eukaryontních organismů, zejména bakterií, kvasinek a hub, za teploty 10 až 50 °C vmíchá do vodných gelů připravených z přírodních materiálů na bázi thermoreversibilních polysacharidů, zejména alginátu nebo κ-carrageenanu, načež se tato směs vytlačuje středem víceproudé koaxiální trysky přičemž ústími trysky ve tvaru mezikruž

se společně vytlačuje gelový materiál bez buněk a vytvořené vrstvené kapky se vkapávají do vody o teplotě 0 až 40 °C nebo vodných roztoků anorganických nebo organických solí o teplotě -15 až 40 °C a po ztuhnutí a nebo vytvrzení se vytvořené pelety oddělí a popřípadě dále zpevňují sušením nebo vymrazováním.

Způsob podle předmětného vynálezu je dále vyznačen tím, že poměr rychlostí vytlačování gelů obsahujících živé buňky a gelů samotných, měřená vytlačovaným objemem na výstupu trysky, činí 0,1 až 1,5 : 1, výhodně 0,5 : 1.

Předmětem vynálezu je dále zařízení k provádění fyzikální imobilizace živých buněk, které sestává z centrální komory s alespoň jednou koncentrickou komorou, přičemž všechny komory jsou opatřeny přívody zpracovávaných materiálů a ústí do víceproude koaxiální trysky, pod kterou je umístěna nádoba s vytvrzovacím roztokem.

Zařízení pro výrobu potahovaných pelet je schematicky znázorněno na obr. 1.

Do centrální komory 1 se za tepla kontinuálně přivádí vodný termoreversibilní gel nebo gel na bázi iontově reversibilních polysacharidů, ve kterém byla rozmíchána suspenze celých nativních buněk prokaryontních nebo eukaryontních organismů. Do koncentrické komory 2 se kontinuálně přivádí gelový materiál, který uvedené buňky neobsahuje. Obě media se společně vytlačují víceproudou koaxiální tryskou 3 a vznikající vrstvené kapky 5 se nechávají kapat do nádoby 4 s vytvrzovacím roztokem, která je výhodně opatřena míchadlem. Tvar a velikost vyráběných pelet, jakož i tloušťka jednotlivých vrstev je dána jednak rychlostí vytlačování jednotlivých medií a jednak vzájemnými poměry průměrů D_1 a D_2 víceproude koaxiální trysky 3.

Výhody způsobu podle vynálezu spočívají v tom, že rigidita takto vyrobených částic je značně zvýšena a prorůstání buněk vlivem jejich množení je značně retardováno. Difúze substrátu resp. živin do dvou resp. vícevrstevných pelet a difúze produktů z těchto pelet významně neovlivňuje reakční rychlost a účinnost biotransformací zvolených substrátů na požadované produkty.

Do potahovaných pelet lze fyzikálně uzavřít buňky různých mikroorganismů, zejména bakterie, kvasinky, imperfektní vláknité houby /plísň/ individuální buňky a mycelium vyšších hub, rostlinné buňky a pod. přičemž podle volby kmene a jeho enzymového vybavení, lze těmito potahovanými peletami katalyzovat různé biotransformace a biokonverze, zejména biotransformaci organických

kyselin a aminokyselin, nebo imobilizované buňky použít pro kvasné procesy, zejména pro přípravu ethanolu.

Tloušťku jednotlivých vrstev pelet a do určité míry i jejich tvar lze regulovat jednak poměrem vnitřních průměrů víceproude koaxiální trysky, jednak poměrem rychlostí vytlačování jednotlivých medií.

Příklady provedení

Příklad 1

1 g vlhké hmoty buněk bakterie *Zymomonas mobilis*, získaných odstředěním 20 h staré kultury, promytím a opětným odstředěním byl suspendován v 5 ml sterilní destilované vody. Získaná suspenze byla vmíchána za laboratorní teploty do 100 ml 3%ního /hmota/objem/ sterilního vodného roztoku Protanalu LF-10/60 /alginát sodný firmy Protan, Norsko/ a směs byla 30 minut intenzivně míchána rychloběžným rotačním míchadlem. Po zhomogenizování byla suspenze buněk *Z. mobilis* v roztoku Protanalu obsahující 1 g vlhkých buněk/100 ml suspenze čerpána peristaltickým čerpadlem do centrální komory 1, současně s 3%ním /hmota/objem/ sterilním vodným roztokem Protanalu LF-10/60 neobsahujícím buňky, který byl druhým peristaltickým čerpadlem čerpán do koncentrické komory 2.

Bylo použito zařízení s rozměry koaxiální trysky 3 $D_1 = 1$ mm a $D_2 = 2,5$ mm. Objemový průtok suspenze buněk v Protanalu měl hodnotu $25 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$, objemový průtok roztoku Protanalu neobsahujícího buňky byl $40 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$. Na výstupu trysky 3 vznikající dvouvrstvé kapky byly vytvrzovány v mírně promíchávaném 5%ním /hmota/objem/ vodném sterilním roztoku CaCl_2 . Vytvrzené částice měly kulovitý tvar se střední velikostí 2,3 mm; tloušťka povrchové vrstvy částic neobsahující buňky byla cca 0,2 až 0,3 mm. Částice byly ponechány v prostředí 5%ního roztoku CaCl_2 a částice byly převedeny do vertikální skleněné kolony s temperačním pláštěm. Celkový objem kolony byl 75 ml, objem částic ve vrstvě byl 56 ml. Do spodní části kolony pod lože dvouvrstvých částic byla kontinuálně přiváděna sterilní fermentační půda o složení: D - glukosa - 150 g/l, kvasničný extrakt 10 g/l, KH_2PO_4 - 1 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,5 g/l a, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 g/l, pH = 6.

Výstupní proud byl odváděn společně s CO_2 v horní části kolony, jejíž teplota byla udržována na hodnotě $30 \pm 1^\circ \text{C}$. Ve výstupním proudu byla sledována zbytková koncentrace glukózy, koncentrace

ethanolu a mikroskopicky přítomnost volných buněk *Z. mobilis*. Objemový průtok fermentační pudy kolonou byl udržován na hodnotě 6 ml/h^{-1} , tomu odpovídá hodnota zředovací rychlosti $D = 0,316 \text{ h}^{-1}$. V průběhu prvních šesti dnů fermentace koncentrace ethanolu ve výstupním proudu postupně vzrostla nad hodnotu $6,4 \text{ g/l}$ a potom došlo k jejímu ustálení v rozmezí $6,4$ až $6,7 \text{ g/l}$. Produkce ethanolu tudíž činila 85 % z teoretické hodnoty. Koncentrace glukózy ve výstupním proudu poklesla postupně ve sledovaném období pod hodnotu 10 g/l a po ustálení se pohybovala v rozmezí $7,6$ až $8,2 \text{ g/l}$. Ve sledovaném období 25 dnů nebyly ve výstupním proudu z kolony detekovány volné buňky *Z. mobilis*, zatímco v referenční koloně obsahující imobilizované buňky stejného mikroorganismu ve stejném materiálu za stejných podmínek použití a manipulace, avšak v nepotahovaných peletách, došlo již 5. den k uvolňování buněk v koncentraci 10^6 až $10^7 \cdot \text{ml}^{-1}$.

Příklad 2

$0,2 \text{ g}$ vlhké pasty vinařských kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* Blastocel Kappa získané odstředěním 6 dnů staré kultury, promytím biomasy sterilní destil. vodou a opětným odstředěním bylo zředěno 2 ml sterilní destil. vody do formy vysoce koncentrované 'suspense'. Tato suspenze byla za laboratorní teploty vmíchána do 100 ml sterilního 3 % /hmota/objem/ vodného roztoku Protanalu LF-10/60 /alginátu sodného firmy Protan, Norsko/. Směs buněk a roztoku Protanalu byla potom 30 minut intenzivně míchána rychloběžným rotačním míchadlem, čímž byla důkladně homogenizována. Získaná homogenní suspenze buněk byla peristaltickým čerpadlem čerpána do centrální komory 1 současně se sterilním 3 % /hmota/objem/ vodným roztokem Protanalu LF-10/60 neobsahujícím buňky, který byl druhým peristaltickým čerpadlem čerpán do koncentrické komory 2. Koaxiální tryska 3 měla průměr $D_1 = 1,5 \text{ mm}$ a průměr $D_2 = 4 \text{ mm}$. Suspenze buněk v roztoku Protanalu byla čerpána objemovým průtokem $55 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$, roztok Protanalu neobsahující buňky byl čerpán objemovým průtokem $56 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$. Dvouvrstvé kapky vznikající v koncentrické trysce 3 a odkapávající s frekvencí cca $2 \text{ kapky} \cdot \text{s}^{-1}$ byly vytvrzovány v 5 % /hmota/objem/ roztoku CaCl_2 , který byl mírně promícháván magnetickým míchadlem. Vytvrzené částice kulovitěho tvaru měly průměr 3 až 4 mm , tloušťka povrchové vrstvy částic neobsahující buňky činila $0,2$ až $0,5 \text{ mm}$. Celkem bylo získáno cca 140 g vlh-

kých částic, které byly ponechány 24 hodin v 5 % roztoku CaCl_2 při teplotě 3 až 5 °C. Potom byly částice odděleny od roztoku CaCl_2 a několikrát dekantovány destilovanou vodou, čímž z nich byl odstraněn příbytek Ca^{2+} iontů. Omyté částice byly potom nasazeny do Erlenmayerových baněk obsahujících filtrovaný sterilní vinný mošt zředěný dest. vodou na koncentraci redukujících cukrů $200 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Násada částic do moštu činila 5 g vlhkých částí/100 ml moštu. Průběh kvašení při laboratorní teplotě byl sledován podle úbytku koncentrace redukujících cukrů a po ukončení kvašení, tj. po poklesu koncentrace reduk. cukrů pod hodnotu 10 až 15 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, byla též stanovena koncentrace vytvořeného alkoholu. Stále stejná násada částic byla použita v celkem 20ti kvasných cyklech, jejichž sumární výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

Číslo cyklu	1	2	3	4	5	6	7	8
Doba kvašení /dny/	8	6	5	5	5	5	4	4
Konečná konc. red. cukrů /mg/ml/	7,3	10,4	12,8	8,7	5,6	9,2	12,8	14,5
Konečná konc. al- koholu /% hmot./	10,8	12,4	12,8	10,6	10,2	12,1	10,4	9,8

9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
5	5	5	4	5	4	4	4	5	5	5	4
8,6	11,7	12,6	14,0	9,3	6,8	8,0	8,1	5,3	9,7	9,1	7,2
11,6	12,1	13,0	14,0	10,8	10,5	12,1	11,1	11,8	12,3	10,1	10,7

V průběhu sledovaných 20ti cyklů kvašení nebylo pozorováno uvolnění kvasinek z částic do moštu, i když bylo pozorovatelné určité zvýšení množství biomasy ve vnitřní oblasti částic.

Příklad 3

50 g vlhké hmoty čerstvé pasty nativních bakteriálních buněk *Alcaligenes metalcaligenes* s apatát amoniak lyázovou aktivitou /specifická aktivita buněk $600 \text{ } \mu\text{mol L-asparagové kyseliny} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ vlhké hmoty/, která byla získána odstředěním z fermentační kapaliny, bylo suspendováno ve 150 ml 5%ního /hmota/objem/ vodného

roztoku κ -carrageenanu /Serva Feinbiochemica, NSR/. Po homogenizaci buněk v gelu pomocí rychloběžného rotačního míchadla byla tato suspenze ze zásobníku čerpána do centrální komory 1 objemovým průtokem 40 ml h^{-1} a z druhého zásobníku byl současně čerpán 3%ní /hmota/objem/ vodný roztok κ -carrageenanu bez buněk do koncentrické komory 2 objemovým průtokem 30 ml h^{-1} . Koaxiální tryska 3 měla rozměry $D_1 = 1 \text{ mm}$ a $D_2 = 2,5 \text{ mm}$. Dvouvrstevné kapky byly kapány do 1M vodného roztoku fumaranu amonného obsahujícího $20 \text{ mg.ml}^{-1} \text{ MgCl}_2$ a 0,05 % /objem/objem/ tenzidu /Slovafol 909/ o teplotě 12 až 15 °C za mírného míchání. Vzniklé pelety byly v uvedeném prostředí mírně míchány po dobu 24 hodin při výměně uvedeného roztoku každých 8 hodin.

Bylo získáno přibližně 500 g vlhké hmoty potahovaných pelet o střední velikosti 2 mm. Tloušťka pvrchové vrstvy neobsahující buňky činila přibližně 0,1 až 0,2 mm. Scezené a promyté pelety sušeny volně na vzduchu po dobu 24 hodin a poté znovu suspendovány do 1M roztoku substrátu avšak neobsahujícího tenzid při koncentraci MgCl_2 1 mg.ml^{-1} . V tomto prostředí byly částice ponechány botnat v lednici do druhého dne. Poté byly částice scezeny a promyty vodou. Střední velikost částic po opětovém nabotnutí činila přibližně 1,6 mm.

Ze 100 g těchto dvouvrstevných pelet bylo vytvořeno pevné lože ve vertikálně umístěné skleněné koloně o vnitřním průměru 25 mm a délce 250 mm. Vytvořeným ložem byl směrem shora dolů čerpán roztok 1M fumaranu amonného objemovým průtokem 10 ml.h^{-1} při teplotě 25 °C. Na výstupu z kolony byla jímána konversní směs a ve zvolených časových intervalech analyzována na množství vytvořené kyseliny L-asparagové. Kolona byla v nepřetržitém provozu po dobu 18 dnů, sloupcem za tuto dobu protéklo 4,32 litrů roztoku substrátu, přičemž průměrný stupeň stechiometrické konverze fumaranu amonného na kyselinu L-asparagovou činil 99,1 %.

Příklad 4

50 g vlhké hmoty čerstvé pasty nativních buněk kvasinky *Rhodotorula glutinis* s fenylalanin amoniak lyázovou aktivitou /specifická aktivita buněk 0,03 $\mu\text{mol L-fenylalaninu min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ suché hmoty/, která byla získána odstředěním z fermentační kapaliny byla suspendována ve 150 ml roztoku κ -carrageenanu o jeho koncentraci a způsobem uvedeným v příkladu 3. Při přípravě dvouvrstev-

ných pelet bylo postupováno stejným způsobem, jako je uvedeno v příkladu 3, s tím rozdílem, že dvouvrstevné kapky byly kapány do 0,05 M roztoku amonné soli kyseliny trans-skořicové obsahujícího 0,05%ní $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,01%ní $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ jehož pH bylo upraveno koncentrovanou čpavkovou vodou na 9,5. Vzniklé pelety byly v prostředí uvedeného roztoku ponechány po dobu 24 hodin v klidu při teplotě 5 °C.

Bylo získáno přibližně 480 g vlhké hmoty potahovaných pelet o střední velikosti 2,4 mm. Tloušťka povrchové vrstvy neobsahující buňky byla stejná jako v příkladu 3. Scezené a promyté pelety byly v tenké vrstvě zmrazeny při teplotě -18 °C přes noc, poté při teplotě místnosti ponechány volně rozmrazit a potom znovu suspendovány do 0,05 M roztoku substrátu o výše uvedeném složení. V tomto prostředí byly částice ponechány v lednici přes noc. Poté byly částice scezeny a promyty vodou. Střední velikost částic po popsaném ošetření činila přibližně 2,1 mm.

100 g těchto dvouvrstevných pelet bylo naplněno do kolony jejíž rozměry jsou uvedeny v příkladu 3. Pevným ložem biokatalyzátoru byl stejným způsobem, který je uveden rovněž v příkladu 3, čerpán 0,05 M roztok substrátu objemovým průtokem $5 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ při teplotě 30 °C a pH roztoku 10,0. Na výstupu z kolony byla jímána konverzní směs a ve zvolených časových intervalech analyzována na množství vytvořeného L-fenylalaninu. Kolona byla v nepřetržitém provozu po dobu 5 dnů, sloupce za tuto dobu proteklo 600 ml roztoku substrátu, přičemž průměrný stupeň stechiometrické konverze amonné soli kyseliny trans-skořicové na L-fenylalanin činil 30 %.

Příklad 5

50 g vlhké hmoty čerstvé pasty nativních bakteriálních buněk *Corynebacterium glutamicum* s fumarázovou aktivitou /specifická aktivita buněk $0,4 \text{ } \mu\text{mol kys. L-jablečné min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ vlhké hmoty/, která byla získána z fermentační kapaliny odstředěním byla suspendována na 150 ml roztoku κ -carrageenanu o jeho koncentraci a způsobem uvedeným v příkladu 3. Při přípravě dvou vrstevných pelet bylo postupováno způsobem uvedeným v příkladu 3 s tím rozdílem, že dvouvrstevné kapky byly kapány do 1M roztoku MgSO_4 při teplotě 10 °C a pH = 7,0. Vzniklé pelety byly cca 30 minut v prostředí uvedeného roztoku mírně míchány a potom ponechány přes noc v klidu při teplotě 5 °C. Poté byly částice scezeny, promyty vodou a suspendovány

v 1M roztoku fumaranu sodného o $\text{pH} = 7,0$, který obsahoval $0,05 \%$ tenzidu /cetyltrimethylamoniumbromid/ a $10 \text{ mg ml}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a částice byly v roztoku mírně míchány po dobu 3 h při teplotě 30°C . Poté byly částice scezeny, promyty vodou a ponechány v tenké vrstvě zmrazit při teplotě -15 až -18°C . Po 5-hodinovém mražení byly pelety rozmrazeny při teplotě místnosti a promyty vodou.

Bylo získáno přibližně 390 g vlhké hmoty potahovaných pelet o střední velikosti částic 2,4 mm. Tloušťka povrchové vrstvy neobsahující buňky byla stejná jako v příkladu 3.

100 g takto připravených vrstevných pelet bylo naplněno do kolony, jejíž rozměry jsou uvedeny v příkladu 3. Pevným ložem částic biokatalyzátoru byl způsobem popsaným v příkladu 3 čerpán 1M roztok substrátu objemovým průtokem 10 ml h^{-1} při teplotě 30°C a $\text{pH} = 7,0$. Na výstupu z kolony byla jímána konverzní směs a analyzována ve zvolených časových intervalech na množství vytvořené kyseliny L-jablečné. Kolona byla v nepřetržitém provozu po dobu 14 dnů, sloupcem za tuto dobu proteklo 3,36 litru roztoku substrátu, přičemž průměrný stupeň stechiometrické konverze fumaranu sodného na kyselinu L-jablečnou činil 98 %.

Příklad 6

20 ml sporové suspenze ve sterilní vodě obsahující $0,1 \%$ /v/v/ tenzidu /Tween 80/, koncentrace spor v rozmezí 10^5 až 10^6 ml^{-1} , získané smytím ze šikmého agaru imperfektní houby *Aspergillus niger*, bylo homogenizováno rychloběžným rotačním míchadlem do 20 ml 6 %ního /hmota/objem/ sterilního 50°C teplého sodného roztoku alginátu sodného. Po homogenizaci byla suspenze spor v roztoku alginátu čerpána způsobem uvedeným v příkladu 1 a 3 %ní sterilní vodný roztok alginátu sodného neobsahující spory rovněž způsobem uvedeným v příkladu 1, s tím rozdílem, že rozměry koaxiální trysky 3 byly $D_1 = 4 \text{ mm}$. Způsob vytvrzování tvořených dvouvrstevných kapek byl rovněž stejný jako v příkladu 1. Vytvrzené částice měly kulovitý tvar se střední velikostí částic přibližně 4 mm. Tloušťka povrchové vrstvy částic neobsahující spory činila 0,4 až 0,5 mm. Částice byly ponechány v prostředí 5 %ního CaCl_2 po dobu 24 h při teplotě 5°C ,

Potom byly částice asepticky zcezeny, promyty sterilní vodou a uloženy do sterilního média následujícího složení /koncentrace

vedeny v % /hmota/objem/: glukóza 10 %, NH_4Cl 0,08 %, NH_4NO_3 0,02 %, močovina 0,1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 %, KH_2PO_4 0,01 %, KCl 0,007 %, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,002 %, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 %, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 %, pH média 3,5. Částice byly inkubovány po dobu 48 hodin při teplotě 30°C na reciprokém třepacím stroji o počtu kyvů 50 min^{-1} ve stejných hmotnostních dílech á 35 g vlhké hmoty částic na 100 ml média v 500 ml Erlenmayerových baňkách uzavřených vatovými zátkami.

Po uvedené době byly částice asepticky odděleny od média, promyty sterilní vodou a asepticky přeneseny do vertikální skleněné kolony jejíž dno bylo opatřeno porcelánovou fritou. Rozměry kolony byly: výška 400 ml, vnitřní průměr 50 mm. Pracovní objem kolony činil 780 ml. Kolona byla opatřena v dolní části příívodem vzduchu s filtrem naplněným skleněnou vatou. Celé zařízení bylo předem vysterilizováno. Náplň kolony činila přibližně 100 g vlhké hmoty vrstvených pelet a 300 ml živné půdy, jejíž složení bylo stejné jak je výše uvedeno, s tím rozdílem, že neobsahovala NH_4NO_3 .

Podmínky biosyntézy kyseliny citronové imobilizovaným myceliem *A. niger* ve vrstvených peletách v popsaném zařízení byly následující: teplota 30°C , vzdušnění $0,6 \text{ l vzduchu} \cdot \text{min}^{-1}$, počáteční hodnota $\text{pH} = 3,5$.

Po 15 dnech kultivace za uvedených podmínek bylo dosaženo produkce kyseliny citronové 60 mg ml^{-1} . Po této době byla živná půda asepticky odsáta a kolona znovu naplněna 300 ml čerstvé sterilní živné půdy o stejném složení a popsaným způsobem a za uvedených podmínek byla biosyntéza opakována se stejnou násadou imobilizovaných buněk celkem třikrát. Průměrný stupeň produkce kyseliny citronové/3 opakované patnáctidenní cykly použití téže násadu biokatalyzátoru činil 54 mg ml^{-1} . V průběhu sledovaných tří cyklů opakovaného použití potahovaných pelet nebylo uvolňování mycelia z částic do média významné.

Příklad 7

Z 0,2 g vlhké pasty kvasínek *S. cerevisiae* byla sterilně připravena koncentrovaná vodná suspenze jako v příkladu 2. Tato suspenze byla při teplotě 48°C vmíchána do 100 ml sterilního 5 %ního /hmota/objem/ vodného roztoku agar-agaru pomocí rychloběžného rotačního míchadla. Získaná homogenní suspenze buněk byla při uvedené teplotě $/48^\circ\text{C}/$ čerpána do centrální komory 1 současně se sterilním

3 %ním /hmota/objem/ vodným roztokem agar-agaru neobsahujícím buňky, který byl při stejné teplotě čerpán do koncentrické komory 2. Zvýšená teplota celého zařízení byla udržována pomocí infra-lampy. Zásobní roztoky byly temperovány ve vodní lázni. Rozměry koaxiální trysky 3, stejně tak jako objemové průtoky suspenze buněk v agaru a agaru neobsahujícího buňky byly stejné jako v příkladu 2. Dvouvrstvé kapky byly vytvrzovány v sterilní ledové vodní lázni při teplotě blízké 0 °C. Ztuhlé částice čočkovitého tvaru měly průměr 4,5 až 5 mm; tloušťka povrchové vrstvy částic neobsahující buňky činila 0,3 až 0,5 mm. Částice byly ponechány v ledové vodě při 2 °C po dobu 24 hodin. Poté byly částice asepticky odděleny a promyty sterilní ledovou vodou.

Dále bylo postupováno při kvašení jako v příkladu 2 v celkem 20 opakovaných kvasných cyklech se stejnou násadou potahovaných pelet. Při době 5 dnů/jeden cyklus bylo dosaženo průměrných hodnot konečných koncentrací/ 20 opakovaných cyklů: 7,8 mg.ml⁻¹ redukujících cukrů a 10,6 % ethanolu. V průběhu sledovaných 20 cyklů nebylo pozorováno uvolnění buněk z částic do externího prostředí.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

248 535

1. Způsob fyzikální imobilizace živých buněk do vrstvených pelet, využitelných pro průmyslové biotransformace a biokonverze, kvasné procesy a biosyntetické výroby, vyznačující se tím, že se suspenze celých nativních buněk prokaryontních nebo eukaryontních organismů, zejména bakterií, kvasinek a hub, za teploty 10 až 50 °C vmíchá do vodných gelů připravených z přírodních materiálů, na bázi termoreversibilních gelů, zejména agaru nebo želatiny, nebo na bázi iontově reversibilních polysacharidů, zejména alginátu nebo carrageenanu, načež se tato směs vytlačuje středem víceproudé koaxiální trysky, přičemž ústímí trysky ve tvaru mezikruží se společně vytlačuje gelový materiál bez buněk a vytvořené vrstvené kapky se vkapávají do vody o teplotě 0 až 40 °C nebo vodných roztoků anorganických nebo organických solí o teplotě -15 až 40 °C a po ztuhnutí a nebo vytvrzení se vytvořené pelety oddělí a popřípadě dále zpevňují sušením nebo vymrazováním.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že poměr rychlostí vytlačování gelů obsahujících buňky a gelů samotných, měřená vytlačovaným objemem na výstupu trysky, činí 0,1 až 1,5 : 1, výhodně 0,5 : 1.
3. Zařízení k provádění způsobu podle bodu 1, vyznačující se tím, že sestává z centrální komory /1/ s alespoň jednou koncentrickou komorou/2/, přičemž všechny komory jsou opatřeny přívody zpracovávaných materiálů a ústí do víceproudé koaxiální trysky /3/, pod kterou je umístěna nádoba /4/ s vytvrzovacím roztokem.

1 výkres

