



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

200 802

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 07 04 77
(21) PV 2318-77

(51) Int. Cl. C 12 N 11/02 ✓

(40) Zveřejněno 31 12 79
(45) Vydáno 01 02 83

(75)
Autor vynálezu

KÁLAL JAROSLAV prof. ing. DrSc.,
ŽŮRKOVÁ EVA ing. CSc.,
DROBNÍK JAROSLAV doc. RNDr. CSc.,
SLAVÍČEK MICHAEL prom. biol.,

VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc.,
ZEMAN ROMAN RNDr.,
ČULÍK KAREL RNDr., PRAHA a
ŠVEC FRANTIŠEK ing. CSc., Kladno

(54) PEVNÝ BIOKATALYZÁTOR K ENZYMOVÉ PŘEMĚNĚ BENZYLpenicilinu NA KYSELINU 6-AMINopenicilánovou
A ZPŮSOB JEHO PŘÍPRAVY

1

Vynález se týká pevného biokatalyzátoru k enzymové přeměně benzylpenicilinu na kyselinu 6-aminopenicilánovou a způsobu jeho přípravy. Pevným biokatalyzátorem se zde rozumí granulovaný preparát sestávající z mikrobiálních buněk obsahujících aktivní enzym penicilinacylázu, které jsou chemicky vázané na povrch pevných částic syntetického polymeru takovým způsobem, že nejsou uvolňovány při technologických operacích nezbytných pro enzymatickou přeměnu benzylpenicilinu na kyselinu 6-aminopenicilánovou (6-APK).

6-APK je výchozí látkou pro přípravu derivátů penicilinu a získává se nejvýhodněji z benzylpenicilinu odštěpením kyseliny fenylactové. Toto štěpení lze provádět chemicky nebo biokatalyticky specifickým enzymem penicilinacylázu (EC 3.5.1.11). Vzhledem k chemické lability molekuly penicilinu je chemický způsob přípravy 6-APK velmi náročný (chemické chránění skupin, teplota reakční směsi kolem -50 °C apod.).

Enzym penicilinacyláza je vytvářen různými mikroorganismy a vhodnou genetickou manipulací se jeho produkce v buňkách dá řádově zvýšit jako je tomu u kmene *Escherichia coli* - 77, získaného podle čs. autorského osvědčení č. 162274; kmen je chráněn podle čs. autorského osvědčení č. 188631.

Pro vlastní konverzi benzylpenicilinu lze použít izolovaný a do určitého stupně předtištěný enzym, nejlépe imobilizovaný na vhodném nosiči, nebo celé buňky produkčního mikroorganismu. Použití celých buněk však představuje značnou ekonomickou úsporu, neboť se vylu-

čuje proces desintegrace buněk, izolace a přečistění enzymu, popřípadě jeho imobilizace na pevný nosič.

Použití buněčné suspenze pro vlastní konverzi benzylpenicilinu má však řadu technologických a ekonomických nedostatků. Vzhledem ke svým malým rozměrům (0,3 až 3 μm) se buňky obtížně z reakční směsi separují a nelze jich použít opakovaně. Proto nejen pro uvažovaný proces, ale i pro jiné enzymové technologické procesy, kde je výhodné používat celých buněk, se hledají způsoby, jak zlepšit jejich separovatelnost. Optimální by byl takový způsob, který by současně umožnil mnohonásobné použití buněčného preparátu. K tomuto cíli bylo v různých pracích navrženo používat částice polymeru obsahujících fyzikálně imobilizované buňky. Nejčastější je způsob uzavření buněk do celého objemu částicek.

Při tomto způsobu, ve vztahu k předmětnému vynálezu, jde především o fyzikální uzavření bakteriálních nativních buněk obsahujících penicilinacylázu nebo částečně narušených např. toluenem do agarových granulí podle čs. patentu č. 113 908, do poly(akrylamidového) gelu (T. Sato, T. Tosa, Y. Chibata, *European. J. Appl. Microbiol.*, **2**, 153, 1976) nebo do vláken triacetátu celulózy (D. Dinelli, *Proc. Biochem.*, **7**, 9, 1972) a využití takto uzavřených nativních buněk v gelové matici pro přípravu 6-APK štěpením benzylpenicilinu obvykle kontinuálním způsobem, technikou cirkulace silně pufovaného roztoku benzylpenicilinu naplní kolony a mimokolonové úpravy pH reakční směsi (pH stat by pass) jednostupňově nebo systémem kaskádově zapojených kolon.

Uvedené způsoby nejsou výhodné z hlediska průmyslového využití, neboť při tomto způsobu je rychlost enzymové reakce silně limitována difuzí dvojí difuzní bariérou (gel a buněčná stěna), dochází k nepříznivému vytvoření gradientu pH lokální kumulací produktů reakce, 6-APK a kyseliny fenyloctové, a k inhibici reakce, v důsledku čehož se snižuje reakční rychlost a stupeň hydrolýzy benzylpenicilinu a reakce se zastavuje obvykle na nízkém absolutním výtěžku (40 až 70 %) při poměrně nízkých koncentracích benzylpenicilinu (1 až 4 %). Další nevýhodou využití fyzikálního uzavření nativních mikrobiálních buněk do gelové matrice je, že nativní buňky v průběhu opakovaného využití lyzují, takže se z nich enzym spolu s balastními bílkovinami uvolňuje, čímž se snižuje rychlost a účinnost enzymové transformace a také kvalita produktu v důsledku obsažených bílkovin (polosyntetické peniciliny z takto připravené 6-APK navozují alergické reakce u člověka a zvířete).

Je proto nezbytně nutné, aby nejen difuze substrátu k enzymu, ale zejména produktů reakce od enzymu byla co nejrychlejší, a aby byl enzym v buňkách chemicky stabilizován. Vieth, Wang a Saini (*Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 565, 1973) použili tak zvané metody komplexování s kolagenem, která spočívá v tom, že kolagen se disperguje, smísí se suspenzí buněk a směs se vysuší na fólii. Pak se na ní působí glutardialdehydem. Takto komplexovali buňky *Streptomyces phaeochromogenes*, obsahující enzym glukózoizomerázu (*Enzyme Engineering*, ed. E. K. Pye a L. B. Wingard jr., Plenum Press, N. Y., 1974). V tomto případě jde patrně o částečné uzavření do sítě polymeru a částečnou vazbu na povrch polymerních částic spolu s chemickou stabilizací enzymu jeho kovalentním zesíťováním uvnitř buněk.

Předmětem vynálezu je pevný biokatalyzátor k enzymové přeměně benzylpenicilinu na kysel-

linu 6-aminopenicilánovou, vyznačený tím, že je tvořen pevným jádrem ze syntetického polymeru o velikosti 10 až 1000 μm , na jehož povrchu jsou prostřednictvím glutaraldehydu navázány buňky vysokoprodukčního kmene *Escherichia coli*-77 obsahující vysoké množství penicilinacylázy. Tyto buňky jsou na povrchu vázány tak pevně, že nejsou uvolňovány při technologicky nezbytných operacích používaných při enzymové konverzi benzylpenicilinu na kyselinu 6-aminopenicilánovou a při následné separaci granulovaného preparátu, a to ani při opakovaných výrobních cyklech. Vazba buněk na syntetický polymer nesoucí na svém povrchu aminoskupiny je zprostředkována glutardialdehydem, čímž dojde i ke stabilizaci enzymu jeho kovalentním zesílením spolu s buněčným obsahem.

Předmětem vynálezu je dále způsob přípravy pevného biokatalyzátoru, vyznačený tím, že na granulovaný syntetický polymer obsahující chemické skupiny schopné reagovat s aminy vybrané ze skupiny zahrnující epoxidový cyklus, aldehydovou skupinu, azidovou skupinu a aktivované estery typu $-\text{CO}-\text{X}$, kde X je zbytek p-nitrofenolu, 2,3,5-trichlorfenolu, 8-hydroxychinolinu, N-hydroxysukcinimidu, N-hydroxyftalimidu se působí amoniakem nebo látkou obsahující nejméně dvě aminoskupiny, z nichž alespoň jedna je primární při teplotě 10 až 100 $^{\circ}\text{C}$ a tlaku 0,1 až 0,3 MPa, po proběhnutí reakce se odstraní přebytečná látka a případné zplodiny a na odseperovaný syntetický polymer nesoucí nyní na svém povrchu amoniskupiny se působí nejprve glutardialdehydem a po odstranění jeho nezreagovaného podílu se granule uvedou ve styk se suspenzí buněk *Escherichia coli* obsahujících aktivní enzym penicilinacylázu.

Epoxidové, aldehydové skupiny, azidy karboxylových kyselin nebo aktivované estery karboxylových kyselin, tj. estery $-\text{CO}-\text{X}$, kde X je zbytek p-nitrofenolu, 2,3,5-trichlorfenolu, 8-hydroxychinolinu, N-hydroxysukcinimidu, N-hydroxyftalimidu, jsou schopné reagovat s látkami obsahujícími aminoskupiny takovým způsobem, že tuto látku pevně váží.

Touto reakcí se získá meziprodukt, představovaný syntetickým polymerem nesoucím na povrchu aminoskupinu, na které se pak pomocí glutardialdehydu chemicky vážou mikrobiální buňky. Tuto vazbu lze provádět tak, že na syntetický polymer se nejprve působí glutardialdehydem a pak se uvede v kontakt se suspenzí buněk, nebo se buňky smísí se syntetickým polymerem v prostředí glutardialdehyd obsahujícím. Styk buněk s glutardialdehydem není na závažu, naopak stabilizuje jejich enzymovou aktivitu. Buňky nelyzují a enzym se z nich neuvolňuje.

Způsobem dle vynálezu lze dále postupovat tak, že suspenze buněk, přiváděna ve styk s granulemi, na které již bylo působeno glutardialdehydem, obsahuje buňky *Escherichia coli*, které byly předběžně uchovávány 20 až 360 minut při teplotě 0 - 30 $^{\circ}\text{C}$ v roztoku obsahujícím 0,5 až 6 % w/w glutardialdehydu o pH 7.

Při přípravě biokatalyzátoru způsobem dle vynálezu je možné postupovat tak, že částice syntetického polymeru, který již zreagoval s amoniakem nebo s látkou obsahující nejméně dvě aminoskupiny, z nichž alespoň jedna je primární, a nese tudíž již na svém povrchu aminoskupiny, se vnese do suspenze buněk *Escherichia coli* obsahujících aktivní penicilinacylázu, kde je v kapalně fázi 0,5 až 10 % w/w glutardialdehydu a ponechá za teploty 20 až 40 $^{\circ}\text{C}$ reagovat 20 až 1440 minut za mírného míchání při pH 6,5 až 8,5.

Předností pevného biokatalyzátoru podle vynálezu je přítomnost buněk na povrchu částic,

ZBO 888

takže difuzní dráha molekul k enzymu není delší než u nativních buněk. Další výhodou je široká volitelnost výchozího syntetického polymeru, jehož fyzikální a chemické vlastnosti nejsou determinovány požadavkem na prostupnost pro substrát a produkty jako je tomu v případě uzavření buněk do hmoty polymeru. Je možné použít nosičů, jež obsahují epoxyskupiny, např. na bázi kopolymerů glycidylmethakrylátů připravené s výhodou podle čs. autorského osvědčení č. 175112, aldehydové skupiny na bázi modifikátů předešlých polymerů podle čs. autorského osvědčení č. 188372 nebo připravené polymerizací nenasycených aldehydů podle čs. autorského osvědčení č. 174529, komerčně dostupných nosičů typu Spheron, Enzacryl, vhodně modifikovaných tak, aby obsahovaly azidové, aktivní esterové a další skupiny schopné reakce vedoucí k vazbě aminoskupiny. Předností způsobu výroby podle vynálezu je možnost volit různé molekuly, kterými se na povrch polymeru zavádějí aminoskupiny. Tím lze upravovat mikrookolí buněk a regulovat délku distanční spojky, kterou jsou polymer a buňka spojeny.

Granulovaný biokatalyzátor může být použit jak pro vsádkový, tak pro kontinuální způsob přeměny benzylpenicilinu na kyselinu 6-aminopenicilánovou, pokud je vhodné udržována reakce media. Je samozřejmé, že použitím jiného mikroorganismu (kmene) lze podle vynálezu připravit biokatalyzátor s odlišným kvalitativním a kvantitativním zastoupením enzymových aktivit.

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

Příklad 1

Do reakční nádoby o objemu 5 l opatřené míchadlem bylo nadávkováno 75 g kopolymeru methakrylaldehyd-divinylbenzen (1,76 mmol/g aldehydových skupin), 2 l 1,4-dioxanu, 1 l vody a 200 g hexamethylendiaminu a směs byla míchána při 20 °C 3 hodiny. Získaný produkt obsahoval po separaci promytím vodou a alkoholem 0,96 mmol/g navázaného diaminu.

Do dvoulitrové nádoby bylo předloženo 1,2 l vody a v ní suspendováno 75 g produktu předchozí reakce a 75 g buněčné pasty *E. coli* - 77 s penicilinacylázovou aktivitou. Za míchání při 30 °C bylo do směsi nadávkováno 60 ml 50% vodného roztoku glutardialdehydu a směs byla udržována při této teplotě 6 hodin. Pevná fáze byla odfiltrována a promyta vodou a stanovena zachycená enzymová aktivita, která činila 70,1 %. Specifická aktivita preparátu činila 0,85 j/mg vlhké hmoty.

Aktivita penicilinacylázy byla hodnocena spektrofotometricky 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 Na-soli benzylpenicilinu za hodinu.

135 g vlhkých popsáním způsobem imobilizovaných buněk bylo vneseno do jednolitrového míchaného skleněného reaktoru a doplněno na objem 500 ml vodou. Touto suspenzí byly provedeny opakované cykly konverze 7 % (w/w) Na-soli benzylpenicilinu na 6-APK vsádkovým způsobem při teplotě 37 °C spolu s kontinuálním udržováním pH koncentrovaným vodním roztokem čpavku na hodnotě 7,8. Hmota vneseného benzylpenicilinu byla korigována na objem vlhkého biokataly-

zátoru. Preparát byl schopen více než 30ti opakovaných cyklů konverzí s průměrným výtěžkem 6-APK 81,32 % teorie za 2,5 hodiny. Celkový hmotový úbytek pevného biokatalyzátoru mezi 1. a 30. opakovaným cyklem použití činil 7,8 % (10,5 g). Tento úbytek byl způsoben ztrátami materiálu při filtraci biokatalyzátoru mezi jednotlivými cykly a ztrátami v důsledku odběru vzorků nutných ke sledování reakční rychlosti v průběhu každého cyklu. Procentuální úbytek aktivity mezi 1. a 30. opakovaným cyklem použití činil 13,5 % (1. cyklus 81 % konverze, 30. cyklus 79 % konverze). Chromatograficky stanovené celkové procento degradace benzylpenicilinu a 6-APK činilo v průměru 4,7 %. V nádobě opatřené míchadlem byla suspendována 10 g kopolymeru methakrylaldehyd-divinylbenzen (1,68 mol/g aldehydových skupin) ve 100 ml směsi 1,4-dioxan - voda (4 : 1), v níž byla rozpuštěny 2 g ethylen diaminu, a směs byla 4 hodiny míchána při teplotě 25 °C. Promytím vodou a alkoholem a filtrací odešperovaná pevná fáze obsahovala 0,94 mmol/g navázaného diaminu.

2 g tohoto produktu byly smíchány s 2 g buněčné pasty uvedeného kmene suspendované ve 30 ml vody a 1,6 ml 50% vodného roztoku glutardialdehydu. Po 6 hodinách reakce při teplotě místnosti bylo přerušeno míchání a pevná fáze byla odfiltrována, promyta vodou a byla suspendována zachycená enzymová aktivita, jak je uvedeno v příkladu 1, která činila 90,5 % a specifická aktivita preparátu činila 0,76 j/mg vlhké hmoty.

5 g vlhkých popsáním způsobem imobilizovaných buněk bylo vneseno do 100 ml míchaného skleněného reaktoru a doplněno na objem 50 ml vodou a byly provedeny opakované cykly konverze 5 % (w/w) Na-soli benzylpenicilinu na 6-APK vsádkovým způsobem za podmínek uvedených v příkladu 1. Byly sledovány tři opakované cykly konverze s průměrným výtěžkem 70 % teoreticky vzniklého množství 6-APK za 2 hodiny.

Příklad 3

Stejným způsobem jako v příkladu 1 byla provedena modifikace 2 g kopolymeru methakrylaldehyd-divinylbenzen se 4 g diethylentriaminu (1,5-diamino-3-azapentanu) a získán produkt obsahující 1,04 mmol/g vázaného aminu. Obdobně jako v příkladu 2 byla provedena reakce s buněčnou pastou uvedeného kmene a získán produkt se zachycenou aktivitou enzymu 57 % a specifickou aktivitou 0,66 j/mg vlhké hmoty.

S 5 g vlhkých popsáním způsobem imobilizovaných buněk bylo provedeno 5 opakovaných cyklů konverze za podmínek uvedených v příkladu 2 s průměrným výtěžkem konverze benzylpenicilinu na 6-APK 63 % teorie za 2 hodiny.

Příklad 4

Produkt obsahující vázaný ethylen diamin získaný způsobem podle příkladu 2 (5 g) byl smísen s 5 ml 50% vodného roztoku glutardialdehydu a 50 ml vody a míchán při teplotě místnosti 1 hodinu. Odfiltrovaná a vodou promytá pevná fáze byla suspendována spolu se stejným množstvím buněčné pasty uvedeného kmene v 75 ml vody a směs byla míchána 24 hodin při teplotě místnosti. Zachycená aktivita enzymu po separaci byla 3,2 % a specifická aktivita byla 0,09 j/mg vlhké hmoty.

Příklad 5

10 g kopolymeru glycidylmethakrylát-ethylendimethakrylát (3,5 mmol/g epoxyskupin) bylo suspendováno při teplotě 80 °C ve 100 ml komerčního roztoku amoniaku a ponecháno 4 hodiny reagovat. Po promytí vodou a separací obsahoval produkt 2,0 mmol/g aminoskupin. 5 g tohoto nosiče bylo smíšeno se 4 ml 50% vodného roztoku glutardialdehydu a 75 ml vody a 5 g buněčné pasty uvedeného kmene. Za neustálého míchání probíhala reakce po dobu 6 hodin, poté byl pevný podíl odfiltrován a promyt vodou. Zachycená aktivita enzymu byla 17 %, specifická aktivita činila 0,90 j/mg vlhké váhy.

S popsaným způsobem získaným preparátem imobilizovaných buněk byly provedeny testy stability enzymové aktivity tak, že 10 g vlhkého preparátu bylo vpraveno do 100 ml Erlenmayerovy baňky a suspendováno ve vodě na objem 50 ml; baňka byla uzavřena zátkou. Suspenze byla třepána na rotačním třepacím stroji o počtu otáček 250/min při 38 °C 60 dnů a v různých časových intervalech byla sledována aktivita enzymu ve filtrátu a sedimentu odebraných vzorků. Po 60 dnech nepřetržitého třepání za výše uvedených podmínek nedošlo k poklesu aktivity enzymu sedimentu; filtrát byl čirý, neopalescentní a jeho enzymová aktivita byla nulová.

Příklad 6

10 g kopolymeru glycidylmethakrylát-ethylendimethakrylát bylo smíšeno s 60 ml ethyldiaminu a reakční směs udržována 4 hodiny při 40 °C. Po promytí vodou obsahoval produkt reakce 2,4 mmol/g vázaného diaminu. Celé množství bylo smíšeno se stejným množstvím buněčné pasty uvedeného kmene a 150 ml vody a po rozmíchání bylo přidáno 8 ml 50% vodného roztoku glutardialdehydu. Po 4 hodinách reakce při teplotě 10 °C byl pevný podíl odseparován a promyt vodou a byla stanovena zachycená aktivita enzymu, která činila 27,8 %, při specifické aktivitě 0,80 j/mg vlhké hmoty.

S popsaným způsobem získaným preparátem imobilizovaných buněk byly provedeny testy stability enzymové aktivity stejně jako je uvedeno v příkladu 5 a po 60 dnech nepřetržitého třepání byl filtrát čirý, neopalescentní a aktivita enzymu v něm byla nulová. K poklesu aktivity enzymu v sedimentu nedošlo.

Příklad 7

5 g polymeru s primárními aminoskupinami, získaného způsobem podle příkladu 5, bylo smíšeno s 5 ml 50% vodného roztoku glutardialdehydu a 50 ml vody. Po jedné hodině míchání při teplotě 20 °C bylo ke směsi přidáno 5 g buněčné pasty uvedeného kmene a pokračováno v míchání dalších 6 hodin. Po separaci pevné fáze a promytí vodou byla zjištěna zachycená aktivita enzymu 5,1 % a specifická aktivita 0,23 j/mg vlhké hmoty.

Příklad 8

Do nádoby opatřené míchadlem, obsahující 100 ml směsi 1,4-dioxan - voda (2 : 1) bylo přidáno 25 g 1,6-diaminohexanu a po rozpuštění přidáno 20 g sférického (perlového) kopolymeru N-(hydroxypropyl)-methakrylamidu s p-nitrofenylovým esterem methakryloyl glycinu síťované-

ho 3-methylenpentamethylen-trimethakrylát (příprava popsána v čs. autorském osvědčení č. 173846). Po 1 hodině míchání za pokojové teploty byl polymer promýván nejprve 1% roztokem Na_2CO_3 a potom destilovanou vodou až do vymizení žlutého zabarvení. Produkt obsahoval 0,61 mmol/g navázaného diaminu. Další postup imobilizace buněk uvedeného kmene byl proveden jako v příkladu 1. Pevná fáze byla odfiltrována a promyta vodou. Stanovená zachycená aktivita enzymu činila 52,4 % a specifická aktivita preparátu 0,78 j/mg vlhké hmoty.

S popsaným způsobem získaným preparátem imobilizovaných buněk byly provedeny testy stability enzymové účinnosti tak, že 27 g vlhké hmoty bylo vpraveno do 200 ml Erlenmayerovy baňky a suspendováno v destilované vodě na objem 100 ml. Dále bylo postupováno jako je uvedeno v příkladech 5 a 6. Po 3 měsících nepřetržitého třepání při 38 °C činila nalezená aktivita enzymu v sedimentu 87 % původní aktivity; filtrát byl čirý, neopaescentní a aktivita enzymu v něm byla nulová.

Příklad 9

Do 250 ml baňky obsahující 100 ml hexanolu a 20 ml bezvodého hydrazinu bylo přidáno 20 g makroporézního 2-hydroxyethyl-methakrylátového gelu (Spheron), uzavřeno zpětným chladičem a zahříváno 8 hodin ve olejové lázni 145 °C teplé. Po vychladnutí byla reakční směs zředěna vodou, hexanol odlit a nosič promyt nadbytkem methanolu a opět vodou. Po vymizení hydrazinu v promývací vodě byl nosič suspendován v 1000 ml ledové vody a přidáno 25 ml konc. kyseliny chlorovodíkové. Za teploty 3 °C byl přidáván za míchání roztok 12,5 g dusitanu sodného ve 20 ml ledové vody. Po proběhnutí reakce byl gel promýván ledovou vodou okyselenou kyselinou chlorovodíkovou až do vymizení reakce na dusitany. Produkt byl suspendován ve 100 ml fosfátového pufru (0,2 M, pH 8,4) a za chlazení bylo přidáno 20 ml 50% roztoku 1,6-diaminohexanu. Hodnota pH reakce se podle potřeby udržovala kolem 8,4. Gel byl dekantován a použit, jak je uvedeno v příkladu 1. Zachycená aktivita enzymu činila 35 % a specifická aktivita 0,54 j/mg vlhké hmoty.

Příklad 10

1 g Enzacryl AH (Koch-Light Lab. Ltd.) byl suspendován v 50 ml 2 N kyseliny chlorovodíkové a ochlazen ledem. Pozvolna za míchání byl přidáván ledový roztok dusitanu sodného (40 ml, 2 %). Po 30 min byl gel promyt ledovou vodou okyselenou kyselinou chlorovodíkovou až do vymizení reakce na dusitany. Vazba 1,6-diaminohexanu a vazba buněk byla provedena jako v příkladech 9 a 1. Zachycená aktivita enzymu činila 27 % a specifická aktivita 0,36 j/mg vlhké hmoty.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Pevný biokatalyzátor k enzymové přeměně benzylpenicilinu na kyselinu 6-aminopenicilánovou, vyznačený tím, že je tvořen pevným jádrem ze synthetického polymeru, obsahujícího chemické skupiny schopné reagovat s aminy, vybrané ze skupiny zahrnující epoxidový cyklus, aldehy-

dovou skupinu, azidovou skupinu a aktivované estery typu $-CO-X$, kde X je zbytek p-nitrofenolu, 2,3,5-trichlorfenolu, 8-hydroxychinolinu, N-hydroxysukcinimidu, N-hydroxyftalimidu o velikosti 10 až 1000 μm na jehož povrchu jsou prostřednictvím glutaraldehydu navázány buňky vysokoprodukčního kmene *Escherichia coli*-77 obsahující vysoké množství penicilinacylázy.

2. Způsob přípravy pevného biokatalyzátoru podle bodu 1, vyznačený tím, že na granulovaný syntetický polymer obsahující chemické skupiny schopné reagovat s aminy vybrané ze skupiny zahrnující epoxidový cyklus, aldehydovou skupinu, azidovou skupinu a aktivované estery typu $-CO-X$, kde X je zbytek p-nitrofenolu, 2,3,5-trichlorfenolu, 8-hydroxychinolinu, N-hydroxysukcinimidu, N-hydroxyftalimidu se působí amoniakem nebo látkou obsahující nejméně dvě aminoskupiny, z nichž alespoň jedna je primární při teplotě 10 až 100 $^{\circ}C$ a tlaku 0,1 až 0,3 MPa, po proběhnutí reakce se odstraní přebytečná látka a případné zplodiny reakce a na odseparovaný syntetický polymer nesoucí nyní na svém povrchu aminoskupiny se působí nejprve glutardialdehydem a po odstranění jeho nezreagovaného podílu se granule uvedou ve styk se suspenzí buněk *Escherichia coli* obsahujících aktivní enzym penicilinacylázu.
3. Způsob přípravy pevného biokatalyzátoru podle bodu 2, vyznačený tím, že suspenze buněk, přiváděna ve styk s granulemi, na které již bylo působeno glutardialdehydem, obsahuje buňky *Escherichia coli*, které byly předběžně uchovávány 20 až 360 minut při teplotě 0 až 30 $^{\circ}C$ v roztoku obsahujícím 0,5 až 6 % hmotnostních glutardialdehydu o pH 7.
4. Způsob přípravy granulovaného biokatalyzátoru podle bodu 2, vyznačený tím, že částice syntetického polymeru, který již zreagoval s amoniakem s látkou obsahující nejméně dvě aminoskupiny, z nichž alespoň jedna je primární, a nese tudíž již na svém povrchu aminoskupiny, se vnese do suspenze buněk *Escherichia coli* obsahujících aktivní penicilinacylázu, kde je v kapalně fázi 0,5 až 10 % hmotnostních glutardialdehydu a ponechá za teploty 20 až 40 $^{\circ}C$ reagovat 20 až 1440 minut za mírného míchání při pH 6,5 až 8,5.