



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202959

(11) (B1)

/22/ Přihlášeno 28 04 79
/21/ /PV 2980-79/

(51) Int. Cl.³
C 12 N 11/04

(40) Zveřejněno 30 05 80

(45) Vydáno 15 10 82

(75)
Autor vynálezu

TURKOVÁ JAROSLAVA ing. CSc., ČESKÝ BROD /ČSSR/, GULAYA VIKTORIA
JEVGENĚVNA CSc., MOSKVA /SSSR/, JIRKŮ VLADIMÍR RNDr. CSc., PRAHA /ČSSR/,
ANANCHENKO SOFIA NIKOLAJEVNA DrSc., TORGOV IGOR VLADIMIROVIČ DrSc.,
MOSKVA /SSSR/, FRYDRYCHOVÁ ANNA ing. a ČOUPEK JIŘÍ ing. CSc., PRAHA
/ČSSR/

(54) Způsob přípravy imobilisovaných buněk *Saccharomyces paradoxus*

Vynález se týká způsobu přípravy imobilisovaných buněk *Saccharomyces paradoxus* VKMu-481, schopných mikrobiální asymetrisace steroidního skeletu, která je založena na stereospecifické redukci jedné z keto-skupin. 3-Methoxy, $\Delta^{-1,3,5/10/,9/11/-8,14}$ -seco-estratetraen-3-ol-14,17-dion je touto cestou v intracelulárním prostředí buňky uvedeného kmene konvertován na 3-methoxy, $\Delta^{-1,3,5/10/,9/11/-8,14}$ -seco-estratetraendiol-3,17 β ,on-14.

Pro tento účel byly dosud imobilisovány buňky *Saccharomyces cerevisiae* VKMu-488, a to zachycením v polyakrylamidovém gelu. Obecným nedostatkem tohoto způsobu imobilisace je, že příslušná enzymatická aktivita zakotvených buněk je negativně ovlivněna difusní bariérou, kterou vytváří použitý gel.

Uvedené nedostatky odstraňuje podle vynálezu způsob přípravy imobilisovaných buněk *Saccharomyces paradoxus*, jehož podstata spočívá v tom, že se buňky kovalentní vazbou zakotví na glycyl-, β -alanyl- nebo ξ -aminokaproyl- derivát hydroxyalkylmethakrylátového gelu.

Základní účinek způsobu přípravy imobilisovaných buněk podle vynálezu spočívá v operačním zjednodušení postupu a vypuštění izolace a purifikace enzymu. Zachováním enzymu v extracelulárním prostředí buňky je zároveň stabilisována jeho aktivita, a to při dodržení optimálních podmínek enzymatické reakce.

Způsob podle vynálezu je vysvětlen na následujících příkladech provedení.

P ř í k l a d 1

Hydroxyalkylmethakrylátový gel /32-40 μ m/ zpracovaný epichlorhydrinem, byl modifikován vazbou hexamethylendiaminu podle následujícího postupu: 1 g gelu byl suspendován v 10 ml 1 M hexamethylendiaminu /pH 12,0/. Po 72 hod míchání za laboratorní teploty byla suspenze převedena do kolonky a gel promyt desetinásobným objemem vody, ethanolu, butanolu a opět ethanolu. Obsah hexamethylendiaminu, stanovený na základě dusíku odpovídá 753 μ mol/g suchého gelu.

P ř í k l a d 2

Hydroxyalkylmethakrylátový gel /100 mg/, modifikovaný postupem popsáným v příkladu 1 byl suspendován ve 2 ml 50 mM fosfátového pufru /pH 5,5/ obsahujícího 50 mg glycinu. Směs byla vystavena 24 hod účinku 100 mg N-ethyl-N'-/3-dimethylaminopropyl/karbodiimidu při laboratorní teplotě. Získaný glycyl-derivát daného gelu /100 mg/ byl suspendován v 0,5 ml 5 % roztoku glutaraldehydu. Po 24 hod míchání byl gel převeden do kolonky a promýván vodou do negativní reakce s 2,4-dinitrofenyl hydrazinem. Po vymytí glutaraldehydu byl gel promyt 300 ml 50 mM fosfátového pufru 5,5.

P ř í k l a d 3

Hydroxyalkylmethakrylátový gel modifikovaný způsobem popsáným v příkladě 1 byl suspendován ve 2 ml 50 mM fosfátového pufru /pH 5,5/, obsahujícího 50 mg β -alaninu. Příprava i aktivace β -alanyl-derivátu byla dále provedena postupem popsáným v příkladě 2.

P ř í k l a d 4

Hydroxyalkylmethakrylátový gel modifikovaný způsobem popsáným v příkladě 1, byl suspendován ve 2 ml 50 mM fosfátového pufru /pH 5,5/, obsahujícího 50 mg kyseliny ξ -aminokapronové. Příprava i aktivace ξ -aminokaproyl-derivátu byla dále provedena postupem popsáným v příkladě 2.

P ř í k l a d 5

Směs obsahující 10^7 buněk na 100 mg nosiče připraveného způsobem uvedeným v příkladech 2 až 4 v 50 mM fosfátového pufru /pH 5,5/ byla míchána při laboratorní teplotě. V případě uvedených nosičů dochází po 120 hod k imobilisaci 30 mg suché hmotnosti buněk na 1 g nosiče. Schopnost zmíněné stereospecifické redukce takto imobilisovaných buněk je přibližně o 25 % nižší než schopnost stejného množství nezakotvených buněk.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy imobilisovaných buněk *Saccharomyces paradoxus*, vyznačený tím, že se buňky kovalentní vazbou zakotví na glycyl-, β -alanyl- nebo ξ -aminokaproyl-derivát hydroxyalkylmethakrylátového gelu.