



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

258818

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 P 9/00

(22) Přihlášeno 04 03 86

(21) PV 1490-86.Y

(40) Zveřejněno 15 01 88

(45) Vydáno 14 04 89

(75)

Autor vynálezu

KOTAL PETR RNDr. CSc., JIRSA MILAN MUDr. DrSc.,
KORDAČ VÁCLAV MUDr. DrSc., ŠPERL JAN,
KAHLER MIROSLAV ing. CSc., PRAHA

(54) Způsob výroby koproporfyriu kultivací kvasinek *Saccharomyces*

Řešení se týká výroby koproporfyriu kvasinkami *Saccharomyces* v anaerobním nebo semi-aerobním prostředí. Pro kontinuální produkci jsou využity kvasinky zabudované do gelu tvořící náplň průtokového reaktoru, ve kterém je koproporfyryn kontinuálně vytvářen z média obsahujícího glukosu a močovinu. Porfyryn je z eluátu izolován sorpční technikou kapalina, pevná fáze.

Vynález řeší způsob výroby koproporfyriu pomocí kvasinek.

Dosavadní způsob získávání prekursorů syntesy hemu spočívá v jejich izolaci z přirozených zdrojů, jako je stolice a moč pacientů s porfyrickou chorobou. Takový nahodilý zdroj je nevhodný pro výrobu, protože tato choroba se vyskytuje jen ojediněle. Jiný způsob je získávání porfyrinů z kultivačního média bakterií (*Arthrobacter*). Uvedený způsob výroby porfyrinů vyžaduje kultivační médium značně složitě (minimálně 13 komponentů), doba kultivace je dlouhá (15 až 30 dnů) a probíhá ve sterilních podmínkách.

Popsané nevýhody se odstraňují biotechnologickým způsobem výroby koproporfyriu podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že k výrobě se používají kvasinky se zvýšenou schopností biosyntetizovat prekursor hemu. Vyznačeným způsobem výroby se kultivují kvasinky v jednoduchém a nesterilním médiu, které obsahuje alespoň zdroj uhlíku popřípadě zdroj dusíku. Biosyntetizovaný koproporfyriu je v kvasinkách shromažďován a vylučován do média, přičemž může být získán jak z kvasinek, tak z média.

Vynález využívá vázaných (imobilizovaných) kvasinek (agar, kolagen, alginát, carrageenan, polystyren atd.), které jsou zejména výhodné z technologického hlediska. Vázané kvasinky lze využívat dlouhodobě s možností kontinuální produkce prekursorů hemu. Imobilisace kvasinek nevyžaduje sterilní podmínky, což vylučuje nebezpečí kontaminace kmene v průběhu kultivace.

Zvýšenou biosyntézu porfyrinů lze dosáhnout např. semiaerobní kultivací. V těchto podmínkách kvasinky produkují násobně větší množství koproporfyriu. V anaerobních podmínkách je inhibován oxygen-dependentní enzym koproporfyriinogenoxigenáza, jehož substrát koproporfyriinogen je hromaděn a vylučován do média. Zvýšenou biosyntézu ostatních prekursorů hemu jako 8, 7, 6, 5 a 2 karboxylových porfyrinů, porfobilinogenu, kyseliny beta-aminolevulové lze dosáhnout mutací užitého kmene známými způsoby, jako např. ultrafialovým zářením, CO^{60} isotopovým ozářením nebo působením činidel jako N-methyl-N-nitro-N-nitroguanosin.

Prekursory hemu se používají jako standardy nebo substráty v metodách klinické biochemie, dále jsou využívány pro diagnostiku a farmakoterapii nebo jako přirozená barviva v potravinářském průmyslu.

P ř í k l a d 1

Kvasinky imobilizované v 3% alginátovém gelu se kontinuálně kultivovaly v průtokovém náplňovém reaktoru o objemu 2 000 ml při zředovací rychlosti $0,20 \text{ hod}^{-1}$. Medium připravené z užitkové vody obsahující jako zdroj uhlíku glukosu (5 g/l) a jako zdroj dusíku močovinu (0,25 g/l) bylo do reaktoru přiváděno bez vzdušnění odspodu pomocí peristaltické pumpy při laboratorní teplotě. Porfyriny se z eluátu okyseleného kyselinou chlorovodíkovou (výsledná koncentrace byla 0,5M) isolovaly technikou extrakce kapalina, pevná fáze pomocí sorbentu SEPARON SIX C18 (velikost částic 60 až 80 μm). Zachycené porfyriny (sorbce je 100 %) se ze sorbentu vymyly metanolem a esterifikovaly přidáním koncentrované H_2SO_4 (výsledná koncentrace byla 5 %).

Estery porfyrinů se dále čistily sloupcovou chromatografií na silikagelu. Jako mobilní fázi se použila směs chloroformu a etylacetátu v poměru 1:1. Posledním stupněm purifikace byla krystalisace ze směsi chloroform, metanol. Tímto purifikačním postupem se získal čistý koproporfyriu (analýza metodou vysokodůlné kapalinové chromatografie a tenkovrstevné chromatografie) bez jakékoliv příměsi dalších porfyrinů. K vyprodukování 3 519 nmol (2 300 μg) koproporfyriu se spotřebovalo 350 g glukosy a 17,5 g močoviny.

P ř í k l a d 2

Postup je stejný jako v příkladu 1, ale jako zdroj uhlíku lze použít kterýko-li zkvasitelný sacharid, meziprodukt Krebsova cyklu nebo aminokyseliny, zdroj dusíku buď vynechat

nebo použít NH_4Cl , aminokyseliny a zvláště porfyrinogenní glycin. Z 11 g glukosy, 11 g glycidu a 11 g jantaranu sodného se vyprodukovalo 70 nmol koproporfyriu, z 55 g glukosy se vyprodukovalo 500 nmolu koproporfyriu a 22 g glukosy a z 11 g močoviny se vyprodukovalo 720 nmolu koproporfyriu.

P ř í k l a d 3

Vázané kvasinky jsou kultivovány stacionárně v mediu uvedeném v příkladě 1 nebo 2 v baňkách obsahujících 50 ml kultivačního media. Z glukosy (5 g/l) se získalo 1,5 nmol koproporfyriu, ze sacharosy (5 g/l) se získalo 1,2 nmol koproporfyriu.

P ř í k l a d 4

Kvasinky se kultivovaly jako v příkladě 3, ale použilo se 10 různých zástupců kmene *Saccharomyces uvarum* a 5 zástupců kmene *Saccharomyces cerevisiae*. V případě *Saccharomyces uvarum* se produkce pohybovala od 12,9 do 39,3 nmol koproporfyriu na g suché váhy, v případě *Saccharomyces cerevisiae* od 23,3 do 126,0 nmol koproporfyriu na g suché váhy.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob výroby koproporfyriu kultivací kvasinek *Saccharomyces* v anaerobním nebo semi-aerobním prostředí vyznačující se tím, že se použijí vázané kvasinky zabudované do gelu, které se kultivují ve vodním mediu při minimální koncentraci 10 mg suché váhy kvasinek na 1 l média, při teplotě media minimálně 4 °C, s obsahem kvasinkami využitelného zdroje uhlíku v minimálním množství 5 mg na 1 média bez vzdušnění, načež se koproporfyriu izoluje.

2. Způsob dle bodu 1 vyznačující se tím, že produkce koproporfyriu probíhá v průtokovém reaktoru, který je alespoň z 1/20 objemu naplněn vázanými kvasinkami a do něhož je medium přiváděno pod tlakem o minimální zředovací rychlosti 0,002 hod^{-1} , medium obsahující vyprodukovaný koproporfyriu a další produkty je z reaktoru průběžně odváděno.

3. Způsob dle bodu 1 a 2 vyznačující se tím, že koproporfyriu je z media izolován technikou extrakce kapalina, pevná fáze s využitím silikagelu potaženého nepolární fází jako sorbentu, z něhož je koproporfyriu eluován vhodným rozpouštědlem.