

# Kontinuální produkce koproporfyriu imobilizovanými kvasinkami a izolace produktu

663.13 579

RNDr. PAVEL KOTAL, CSc., JAN ŠPERL, Doc. MUDr. MILAN JIRSA, DrSc., Prof. MUDr. VÁCLAV KORDAČ, DrSc. Laboratoř pro patofyziologii krvetvorné soustavy a jater při I. interní klinice fakulty všeobecného lékařství UK v Praze

Ing. MIROSLAV KAHLER, CSc., Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

**Klíčová slova:** koproporfyriu, imobilizované kvasinky, alginát, gel, *Saccharomyces cerevisiae*, kontinuální produkce, izolace, purifikace

## ÚVOD

Porfyriny jsou cyklické tetrapyrroly vznikající spojením čtyř pyrrolových jader methinovými můstky. Biochemicky jsou fyziologickými prekurzory tetrapyrrolových komplexů s kovem jako je hem, chlorofyl a kobalamin. V přírodě jsou tyto komplexy obsaženy např. v krevním barvivu, listové zeleni a cytochromech, což jsou sloučeniny zprostředkovávající základní biologické funkce jako je transport kyslíku, fotosyntéza a biologická oxidace. Proto i biosyntéza hemu patří fylogeneticky mezi nejstarší metabolické dráhy a je totožná u všech eukaryontních organismů.

Porfyriny se používají jako standardy v metodách klinické biochemie a jako substráty pro stanovení aktivit enzymů biosyntézy hemu. Perspektivní je využití porfyrinů a jejich derivátů v diagnostice a terapii nádorových onemocnění [1]. Pro tento účel se využívá schopnosti porfyrinů bromadit se v nádorové tkáni. Tyto tkáně lze potom snadno diagnostikovat na základě charakteristické červené fluorescence nakumulovaných porfyrinů. Při terapeutickém využití porfyrinů se nakumulované porfyriny excitují vhodným světelným zdrojem, přičemž se tkáň v blízkém okolí nekrotizuje pravděpodobně vznikajícím singletovým kyslíkem [2].

Volné porfyriny nalézáme v přírodě za nepatologických podmínek pouze výjimečně (např. protoporfyriu se nachází v harderské žláze hlodavců a ve skořápkách vajec některých ptáků, uroporfyriu v krunýři měkkýšů, v peří papouška Turacca apod.). Výskyt většího množství porfyrinů byl zaznamenán u některých mikroorganismů jako u bakterií rodu *Arthrobacter*, *Corynebacterium diptheria*, *Rhodospseudomonas spheroides*, *Mikrococcus lysodeikticus*, *Brevibacterium*, *Sarcina bacteria*, kvasinek atd. [3–7].

Dosud jsou porfyriny převážně získávány izolací z exkretů pacientů s porfyrií chorobou. Trh dlouhou dobu zásoboval prof. With porfyriny izolovanými z moče býka postiženého touto chorobou. Byl též popsán způsob izolace porfyrinů z růstového média bakterií rodu *Arthrobacter* [8].

Vzhledem k tomu, že do budoucna lze předpokládat zvýšený zájem o porfyriny, jsou v současné době hledány jejich nové zdroje. Jelikož je syntéza hemu totožná u všech eukaryontních organismů, nabízí se využít pro syntézu porfyrinů metabolickou dráhu syntézy hemu. Biosyntéza hemu je však složitý metabolický proces vyžadující podle druhu výsledného produktu 4 až 7 enzymů této metabolické dráhy. Biosyntéza hemu je ještě komplikována dvojitou buněčnou lokalizací, neboť syntéza začíná v mitochondriích, přesouvá se do cytosolu a je zakončena opět v mitochondriích. Mimoto substrát tohoto cyklu, sukcinyl koenzym A, je těžko dostupný, a proto je simulace tohoto biosystému „in vitro“ velmi obtížným problémem. Zatím se ji, pokud je nám známo, nepodařilo extracelulárně uskutečnit.

My jsme se pokusili uvedený problém vyřešit využitím celých buněk za účelem intracelulární produkce porfyrinů „in vivo“. Pro dlouhodobou kontinuální kultivaci jsme použité buňky — kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* — imobilizovali do alginátového gelu.

## MATERIÁL A METODY

### Kultivace kvasinek

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (RIBM-75) se semiaerobně kultivovaly v syntetickém médiu [kvasničný

autolyzát 5,0 g; močovina 1,0 g; síran hořečnatý 0,5 g; dihydrogenfosforečnan draselný 1,0 g; sacharosa 100,0 g v 1 litru vody] po dobu 36 h při 38 °C [9].

### Imobilizace kvasinek

Kvasinky sklizené v exponenciální fázi se po promytí imobilizovaly v 3% Ca-alginátu = (Ø pelet 1,8 až 2,2 mm, koncentrace kvasinek — 1,25 g sušiny ve 100 ml pelet). Pelety se skladovaly při 4 °C. Původní aktivitu zachovávaly nejméně 1 měsíc.

### Zařízení pro kontinuální kultivaci

Reaktor byl vytvořen kolonou (25 X 300 nebo 70 X 700 mm), do níž se médium dávalo peristaltickou pumpou (Zalimp 304, PLR). Náplň reaktoru tvořilo 150 nebo 1 800 ml peletek. Prokvašený substrát se jímá v kolektoru frakcí (FCC 60, k. p. Laboratorní přístroje, Praha).

### Izolace porfyrinů

Porfyriny se izolovaly z okyseleného prokvašeného substrátu sorpční technikou na SEPARON SIX C18 (k. p. Laboratorní přístroje, Praha). Sorbované porfyriny se promyly vodou a eluovaly methanolem.

### Purifikace porfyrinů

#### Esterifikace

Porfyriny se esterifikovaly 5% kyselinou sírovou v methanolu. Estery porfyrinů se vytřepaly do chloroformu. Chloroformový roztok esterů porfyrinů se neutralizoval 5% hydrogenuhličitanem sodným a třikrát promyl destilovanou vodou.

#### Adsorpční chromatografie

Estery porfyrinů se dělily na sloupci silikagelu (30 X 700 mm) v mobilní fázi chloroform, n-heptan (1:1, obj.). Vzorek se nanášel v 10 ml mobilní fáze.

#### Krystalizace

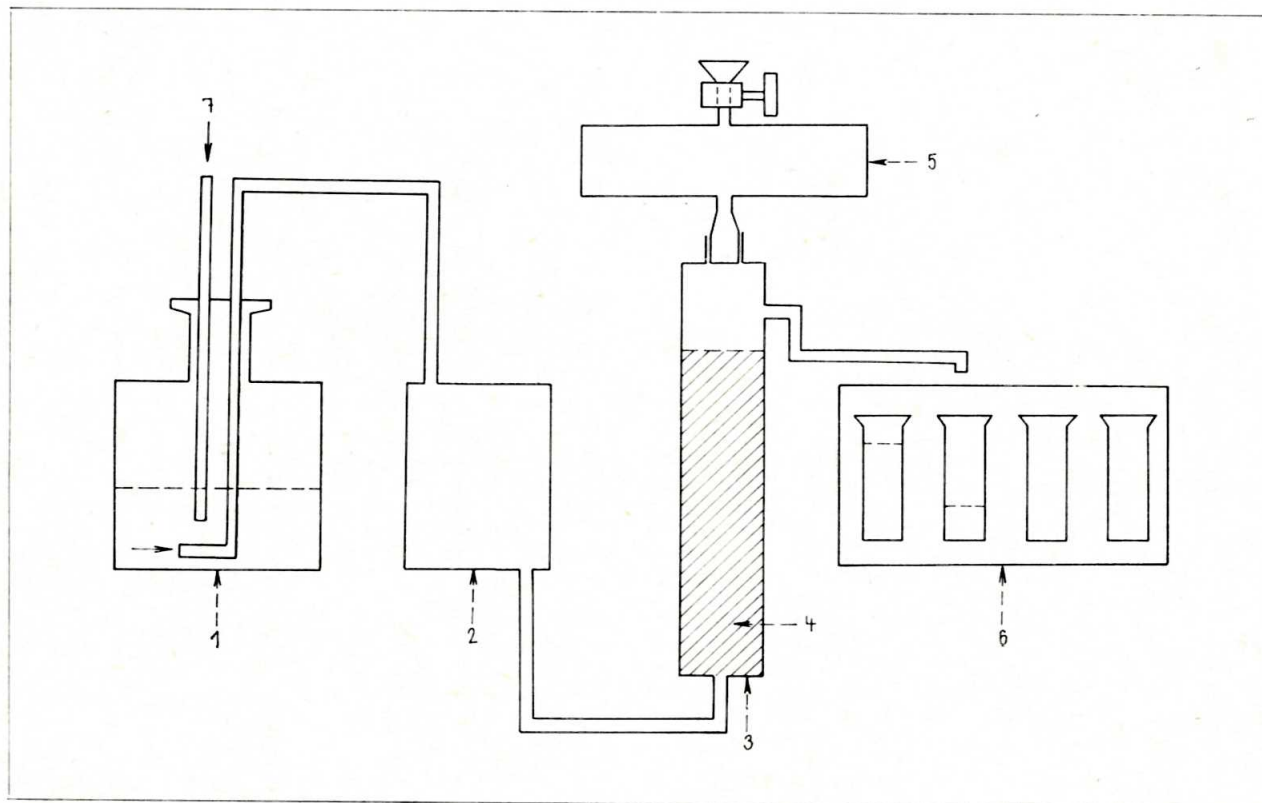
Porfyriny se překrystalizovaly ze směsi chloroform-methanol při laboratorní teplotě.

#### Kvalitativní analýza

Chloroformový odparek se rozpustil v definovaném množství  $\text{CHCl}_3$  a porfyriny se analyzovaly technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Pro analýzu jsme použili přístrojovou sestavu k. p. Laboratorní přístroje Praha. Vzorky se separovaly na koloně SEPARON SIX  $\text{NH}_2$  v mobilní fázi skládající se z 57 % ethylacetátu v n-heptanu (obj.). Průtok byl 0,4 ml · min<sup>-1</sup>. Vzorek se nastříkával v množství 10  $\mu\text{l}$  [10].

#### Kvantitativní analýza

Koncentrace porfyrinů v prokvašeném substrátu okyseleném zředěnou kyselinou chlorovodíkovou [ $c = 1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ] v poměru 1 + 1 (obj.) se stanovila fluorimetricky na spektrofotometru MPF 44 (Perkin Elmer, USA; excitace 400 nm, emise 594 nm) nebo spektrofotometricky na spektrofotometru Spekord M-40 (Carl Zeiss Jena, NDR; excitace 400 nm) [9, 12]. Koncentrace glukosy a močoviny se stanovila na automatickém analyzátoru ASTRA 4 (Beckman, USA). Sacharosa se před stanovením hydrolyzovala kyselinou sírovou [ $c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $T = 70^\circ\text{C}$ ,  $t = 5 \text{ min}$ ]. Koncentrace glycinu se stanovila fotometricky reakcí s p-benzochinonem [11].



Obr. 1. Schéma aparatury pro kontinuální kultivaci imobilizovanými kvasinkami

1 — nádoba s kultivačním médiem, 2 — peristaltická pumpa, 3 — průtokový reaktor, 4 — náplň imobilizovaných kvasinek, 5 — jímka na CO<sub>2</sub>, 6 — kolektor frakcí, 7 — přívod CO<sub>2</sub>

## VÝSLEDKY

### Produkce porfyrinů

#### Vsádková kultivace

Nejprve jsme se snažili najít nejvhodnější složení média pro produkci porfyrinů. Pro tento účel jsme v první fázi imobilizované kvasinky kultivovali vsádkově při teplotě 20 °C (±1 °C). Z celé řady zkoušených substrátů se ukázalo jako nejvhodnější médium obsahující glukosu a močovinu. Tabulka 1 shrnuje výsledky vsádkových kultivací kvasinek při vzrůstajících koncentracích glukosy a močoviny. Z tabulky je zřejmé, že maximální produkce koproporfyriu se dosáhla v případě glukosy při koncentraci 9 g.l<sup>-1</sup> a v případě močoviny při 5 g.l<sup>-1</sup>. Kultivační doba u těchto zkoušek byla 144 hodin.

#### Kontinuální kultivace

Pro kontinuální produkci porfyrinů jsme sestavili aparaturu, jejíž schéma je na obrázku 1. Médium se přivádí ze zásobní nádoby peristaltickou pumpou odspodu do

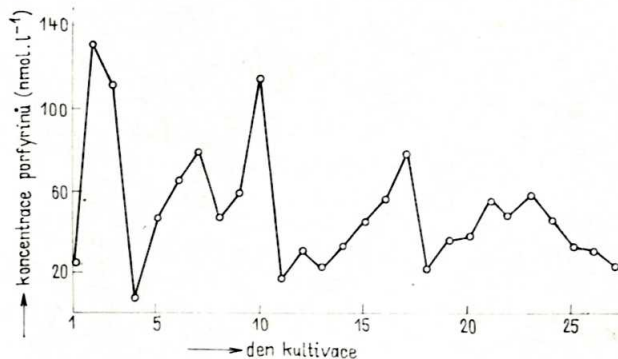
průtokového reaktoru naplněného imobilizovanými kvasinkami. Objem reaktoru činil 200 ml v analytické a 2000 ml v semipreparativní fázi. Zředovací rychlost byla ve všech případech 0,2 h<sup>-1</sup> a teplotní režim se udržoval ve stejném rozsahu jako vsádkové kultivace. Prokvašený substrát se odváděl přepadem od hladiny do kolektoru frakcí nebo se přímo zpracovával. S touto aparaturou v analytickém měřítku (náplň reaktoru činila 150 ml imobilizovaných kvasinek) jsme ověřili výsledky získané při vsádkové kultivaci. Ve dvacetičtyřhodinových intervalech se sledovala v příslušných frakcích závislost produkce porfyrinů na složení média. Tyto experimenty prokázaly, že v této sestavě je možno produkovat porfyriny alespoň jeden měsíc při jedné náplni reaktoru. Produkce porfyrinů kolísala přibližně ve čtyřdenních intervalech (obr. 2).

Výsledná celková produkce porfyrinů v patnáctidením kultivačním cyklu je shrnuta v tabulce 2. Z tabulky je zřejmé, že nejvyšší produkce, tj. 720 nmolů porfy-

Tabulka 1. Vliv koncentrace substrátů (glukosy a močoviny) v médiu na produkci koproporfyriu imobilizovanými kvasinkami při vsádkových kultivacích

Koncentrace substrátů v médiu (g.l <sup>-1</sup> )	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Produkce a) porfyrinu (nmol.l <sup>-1</sup> )	29	34	40	43	58	88	102	88	102	140	66
Produkce b) porfyrinu (nmol.l <sup>-1</sup> )	18	26	19	60	60	90	53	40	33	35	29

a) z glukosy  
b) z močoviny



Obr. 2. Produkce porfyrinů při kontinuální kultivaci imobilizovanými kvasinkami

Složení média — 5 g.l<sup>-1</sup> glukosy, objem reaktoru — 150 ml peletek, zředovací rychlost — 0,2 h<sup>-1</sup>

Tabulka 2. Závislost produkce porfyrinů imobilizovanými kvasinkami na složení média<sup>a)</sup>

Složení média	Koncentrace substrátu (g · l <sup>-1</sup> )	Spotřeba substrátů (%)	Produkce koproporfyriu (nmol)
1. sacharosa	1	100	70
glycin	1	0–1	
jantarán sodný	1	b	
2. glukosa	5	30–50	500
3. glukosa	2	100	720
močovina	1	1–2	

a) 15denní produkce, průtokový reaktor byl naplněn 150 ml peleték, zředovací rychlost 0,2 l · h<sup>-1</sup>  
b) neměřeno

rinů, se dosáhlo při použití glukosy a močoviny jako substrátů. V průběhu těchto experimentů nás také zajímalo, ve které části reaktoru se nejvíce produkuje porfyrin a jaká je aktivita kvasinek z hlediska produkce porfyrinů v různých částech reaktoru. Proto jsme z různých výšek sloupce peleték odebírali kvasičí substrát a měřili koncentrace porfyrinů. Po ukončení kontinuální kultivace jsme sloupec peleték rozdělili podle výšky na čtyři frakce (A — spodní až D — horní) a vsádkovou kultivaci ve stejném médiu určili zachovaný stupeň schopnosti syntetizovat porfyriny. Výsledky jsou zachyceny v tabulce 3. Hodnoty koncentrace porfyrinů v průběhu kontinuální kultivace dokládají, že porfyriny jsou maximálně vytvářeny ve spodní části kolony, tj. tou frakcí kvasinek,

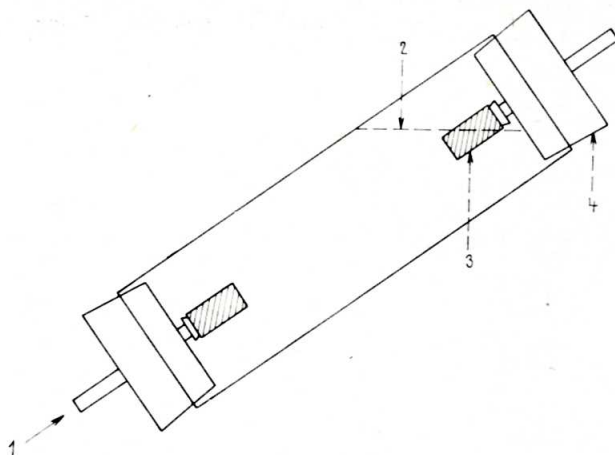
Tabulka 3. Gradient koproporfyriu na koloně a rychlost stárnutí kvasinek

Frakce	Koncentrace koproporfyriu <sup>a)</sup> (nmol · l <sup>-1</sup> )	Koncentrace koproporfyriu <sup>b)</sup> (nmol · l <sup>-1</sup> )
E	7	7 5 3 2
D	8	
C	8	
B	6	
A	4	

a) v reaktoru

b) při vsádkové kultivaci (4 ml peleték, 50 ml média, 48 h)

ke které se přivádí čerstvé médium. Nižší hodnotu koncentrace porfyrinů v prokvašeném substrátu vytékajícím z reaktoru (frakce E) než ve frakci D lze vysvětlit obtokáním média podél stěn kolony. Tabulka dále ukazuje,



Obr. 3. Schéma reaktoru pro kontinuální kultivaci imobilizovanými kvasinkami (70 × 700 mm)  
1 — přívod média, 2 — hladina naplně, 3 — síťka pro oddělení naplně, 4 — pryžová zátka

že kvasinky z frakce A rychleji ztrácejí schopnost syntetizovat porfyriny. Z těchto experimentů vyplývá, že výhodnější bude použití reaktoru s lepší dostupností substrátu k jednotlivým vrstvám imobilizovaných kvasinek.

Další experimenty jsme prováděli v semipreparativním měřítku s reaktorem o objemu 2 000 ml (obr. 3). Výsledky semipreparativních kultivací jsou shrnuty v tabulce 4.

Tabulka 4. Semipreparativní produkce koproporfyriu imobilizovanými kvasinkami

Experiment	Doba kultivace (týdny)	Objem eluátu (l)	Spotřeba substrátů		Produkce porfyrinů (mg)
			glukosa (g)	močovina (g)	
a)	c)				
1	3	70	350	17,5	2,30
b)					
2	2	120	600	12,0	4,13

a) složení média (5 g glukosy; 0,25 g močoviny)

b) složení média (5 g glukosy; 0,1 g močoviny)

c) kultivace prováděna pouze v pracovních dnech

Při těchto experimentech jsme vyprodukovali 2,30 a 4,13 mg koproporfyriu z 350 a 600 g glukosy. Prokvašený substrát obsahující porfyriny jsme použili pro izolaci porfyrinů.

#### Izolace porfyrinů

Protože koncentrace koproporfyriu v médiu byla velmi nízká (řádově 100 nmol · l<sup>-1</sup>), museli jsme použít účinný izolační postup. Nejlepších výsledků jsme dosáhli sorpční technikou kapalina-pevná fáze. Jako sorbent jsme použili silikagel potažený nepolární fází (SEPARON SIX C18). Výtěžek této metody byl téměř 100%, přičemž porfyriny se ze sorbentu vymývaly methanolem.

Dále jsme přistoupili k purifikaci vyzolovaného koproporfyriu. Prvním stupněm byla esterifikace ve směsi methanol-kyselina sírová, následovaná výtřepem esterů porfyrinů do chloroformu. Porfyriny jsme dále čistili již ve formě esterů sloupcovou chromatografií na silikagelu. Získanou frakci jsme následně dočistili krystalizací ze směsi chloroform-methanol při laboratorní teplotě.

Čistotu produktů jednotlivých stupňů purifikace jsme kontrolovali technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5. Čistotu výsledného produktu jsme také ověřili technikou tenkovrstvé chromatografie (TLC). Výsledný produkt byl z hlediska HPLC i TLC analýzy čistý. Shoda naměřených spektrálních dat s daty literárními potvrdila čistotu výsledného produktu. Celkové ztráty při purifikačních a izolačních stupních nepřesáhly 55 %.

Tabulka 5. Analýza produktů z jednotlivých stupňů purifikace<sup>a)</sup>

Vzorek	Zastoupení jednotlivých frakcí (%)			
	4 COOH <sup>b)</sup>	5 COOH <sup>c)</sup>	Suburoporfyryny	Ostatní příměsi
d)				
1	96,8	0,9	0,3	2,0
e)				
2	99,2	0,8	0	0
f)				
3	100,0	0		0

a) analýza provedena HPLC

b) koproporfyriu

c) pentakarboxyporfyriu

d) vzorek po extrakci kapalina-pevná fáze

e) vzorek po chromatografii na koloně plněné silikagelem

f) vzorek po krystalizaci

#### DISKUSE

Využití semiaerobně pěstovaných kvasinek, jako modelu pro studium látek ovlivňujících syntézu porfyrinů,

nás inspirovalo k jejich využití pro produkci porfyrinů. Za účelem získání dlouhodobého zdroje porfyrinů jsme kvasinky imobilizovali do alginátového gelu.

Kontinuální produkce jsme dosáhli sestavením jednoduché aparatury. Původní médium používané pro nárůst buněčné hmoty jsme postupně zjednodušovali a obměňovali. Experimentálně jsme prokázali, že životnost imobilizovaných kvasinek je dostatečná i bez kvasničného extraktu, a že pro produkci porfyrinů kvasinkám postačuje médium skládající se ze sacharosy a z prekurzorů syntézy hemu, glycinu a jantaranu sodného. Vyšší produkce je dosaženo při použití samotné glukosy jako uhlíkatého zdroje. Nejlepších výsledků jsme dosáhli s médiem obsahujícím glukosu jako zdroj uhlíku a močovinu jako zdroj dusíku. Jelikož molární poměr spotřebované glukosy k močovině je daleko vyšší než teoretický molární poměr pro tvorbu porfyrinů (6 molů glukosy a 2 moly močoviny na 1 mol koproporfyriu), je glukosa více využívána pro jiné metabolické pochody.

Pravidelné kolísání produkce porfyrinů při kontinuálním způsobu kultivace pravděpodobně souvisí s životními cykly kvasinek, neboť uvažovaný vliv kyslíku rozpustného v médiu (koncentrace kyslíku stoupá vždy při doplnění média) jsme vyloučili zvýšením tenze oxidu uhlíkatého v médiu.

Semiaerobně kultivované kvasinky produkují převážně koproporfyriu (viz analýza HPLC). To je způsobeno pravděpodobně inhibicí koproporfyrogen III-oxidasy (E.C.1.3.3.3), která využívá kyslíku jako akceptoru vodíku uvolněného při dehydrogenaci [12].

#### Izolace

Použitý způsob izolace, extrakce kapalina-pevná fáze, umožňuje relativně selektivní zakoncentrování porfyrinů z média i přes jejich nízkou koncentraci při vysokém výtěžku. Následující purifikační postup, zpracovávající porfyriny ve formě esterů, umožňuje získat z hlediska spektrální analýzy, HPLC a TLC čistý konečný produkt. Celkové ztráty při izolaci nepřesáhly 55 %.

#### ZÁVĚR

Jednoduchost uvedeného postupu pro produkci i izolaci porfyrinů v kontinuálním provedení umožňuje podle našeho názoru zvětšení parametrů aparatury, a tím i zvýšení produkce, kterou jsme pouze vyzkoušeli v podmínkách klinické laboratoře s nízkoobjemovým reaktorem (2 000 ml). Univerzálnost navrženého postupu umožňuje využití různých mutant kvasinek se schopností produkovat další meziproducty syntézy hemu. Při hodnocení uvedeného postupu je třeba uvážit, že se jedná o produkt, který v malém množství skrývá značnou hodnotu. Proto je v případě porfyrinů zajímavá i nízkoobjemová produkce.

#### Poděkování

Autoři děkují Ing. B. Pardonové, Ing. H. Šedové a Ing. M. Poledníkové za přípravu imobilizovaných kvasinek, Ing. J. Vernerové, CSc. (Výzkumný ústav pivovarský a sladařský) a Doc. L. Šilhánkové, CSc. (Vysoká škola chemickotechnologická) za cenné diskuse.

#### Literatura

- [1] MOAN, J.: Photochem. Photobiol., **43**, 1986, s. 681—690
- [2] KESSEL, D.: Int. J. Radiat. Biol., **49**, 1986, s. 901—907
- [3] MOORE, M. R.: Clinics in Hematology (Goldberg, A., Moore, M. R. vydavatelé), s. 227—252, W. B. Saunders Company Ltd, London, Philadelphia, Toronto 1980
- [4] LASCELLES, J.: Biochem. J., **62**, 1956, s. 78—93
- [5] PAPPENHEIMER, A. M.: J. Biol. Chem., **167**, 1974, s. 251—259
- [6] GRAY, C. H., HOLT, L. B.: Biochem. J., **43**, 1948, s. 191—193
- [7] TOWNSLEY, P. H., NEILANDS, J. B.: J. Biol. Chem., **224**, 1957, s. 695—705
- [8] KOJIMA et al.: Process for production coproporphyrin III, United States patent Int. C13 C12P 17/16, 1982
- [9] KOTAL, P., VERNEROVÁ, J., JIRSA, M., KORDAČ, V.: Int. J. Biochem., **16**, 1984, s. 1087—1090
- [10] KOTAL, P., PORSH, B., JIRSA, M., KORDAČ, V.: J. Chromatogr., **333**, 1985, s. 141—151
- [11] VOLMUT, J., SLUGENOVÁ, E.: Biochem. clin. bohém., **12**, 1983, s. 333—342
- [12] KOTAL, P., JIRSA, M., KORDAČ, V.: Int. J. Biochem., **18**, 1986, s. 57—61

Lektoroval Ing. Pavel Hasal, CSc.

Kotal, P. - Šperl, J. - Jirsa, M. - Kordač, V. - Kahler, M.: Kontinuální produkce koproporfyriu imobilizovanými kvasinkami a izolace produktu. Kvas. prům., **34**, 1988, č. 6, s. 168—172.

V práci je navržen způsob biotechnologické produkce a izolace koproporfyriu. Pro produkci porfyrinů jsme použili kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (RIBM-75). Tyto kvasinky jsme imobilizovali v 3% alginátovém gelu a takto stabilizované použili jako náplň průtokového reaktoru. Koproporfyriu je kontinuálně vytvářen z média obsahujícího uhlíkatý a dusíkatý zdroj (glukosa a močovina). Jednoduchá aparatura umožňuje dlouhodobou produkci při jedné náplni reaktoru (alespoň 30 dní).

Porfyriny jsou z média izolovány a koncentrovány extrakčně technikou kapalina-pevná fáze (SEPARON SIX C18) při vysokém výtěžku. Extrahované porfyriny jsou esterifikovány a jako estery čištěny chromatograficky na sloupci silikagelu a krystalizačně. Výsledný produkt byl z hlediska vysokoučinné kapalinové chromatografie čistý. Popsaný postup umožňuje využití různých mutant kvasinek se schopností produkovat ostatní meziproducty syntézy hemu.

Котал, П. - Шперл, Я. - Иирса, М. - Кордач, В. - Калер, М.: Континуальная продукция копропорфрина иммобилизованными дрожжами и изоляция продукта. Квас. прум., **34**, 1988, № 6, стр. 168—172.

В работе предложен способ биотехнологического производства и изоляции копропорфрина. Для продукции порфиринов были применены дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (RIBM 75). Эти дрожжи были иммобилизованы в 3 % альгинатовом геле и таким образом стабилизированные применены в качестве наполнения проточного реактора. Копропорфрин непрерывно образуется из среды, содержащей углеродистый и азотистый источники (глюкоза и мочевина). Простая аппаратура позволяет долговременную продукцию при одном наполнении реактора (не менее чем 30 дней).

Порфирины из среды изолируются и концентрируются путем экстрагирования способом жидкость-твердая фаза (SEPARON SIX C18) при высоком выходе. Экстрагированные порфирины подверглись эстерификации и как сложные эфиры они очищались хроматографически на столбце силикагеля и путем кристаллизации. Продукт-результат был с точки зрения высокоэффективной жидкостной хроматографии чистый. Описанный способ дает возможность использовать разные мутанты дрожжей с способностью вырабатывать остальные промежуточные продукты.

Kotal, P. - Šperl, J. - Jirsa, M. - Kordač, V. - Kahler, M.: Continuous Production of Coproporphyrin with Immobilized Yeasts and Product Isolation. Kvas. prům., **34**, 1988, No. 6, pp. 168—172.

A procedure of the biotechnological production and isolation of coproporphyrin is described. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* (RIBM-75) was used for porphyrin production. The yeasts were immobilized in 3% alginate gel and filled in the continuous reactor. Coproporphyrin was continuously produced in the medium containing a sources of carbon and nitrogen (glucose and urea). The simple apparatus permitted a long time production with one filling of the reactor (about 30 days). Porphyrins were isolated and concentrated from the medium using an extraction liquid-solid phase (SEPARON SIX C18) with a high yield. After extraction porphyrins were esterified and in this form purified by chromatography using silicagel and crystallization. The product was pure according to the HPLC test. The procedure permits the utilization of various yeast mutants that producing other intermediates of hem synthesis.

Kotal, P. - Šperl, J. - Jirsa, M. - Kordač, V. - Kahler, M.: Kontinuierliche Produktion von Koproporphyrin durch immobilisierte Hefen und Isolation des Produkts. Kvas. prům., **34**, 1988, Nr. 6, S. 168—172.

In der Arbeit wird ein biotechnologisches Verfahren zur Produktion und Isolation von Koproporphyrin vor-

geschlagen. Zur Produktion der Porphyrine wurden die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* (RIBM-75) angewendet. Diese Hefen wurden im 3% Alginatgel immobilisiert und in dem so stabilisierten Zustand als Füllung des Durchfluß-Reaktors benützt. Das Koproporphyrin wird aus dem Medium, das eine Kohlenstoff- und auch Stickstoffquelle (Glukose und Harnstoff) enthält, kontinuierlich produziert. Die einfache Apparatur ermöglicht eine langfristige Produktion aus einer Füllung des Reaktors [wenigstens 30 Tage].

Die Porphyrine werden aus dem Medium in Extrak-

tionsverfahren mittels der Technik Flüssigkeit-feste Phase [SEPARON SIX C18] mit einer hohen Ausbeute isoliert und konzentriert. Die extrahierten Porphyrine werden esterifiziert und als Ester gereinigt, und zwar chromatographisch auf Silikagelsäule und durch Kristallisation. Das Endprodukt kann von Standpunkt hochwirksamer Flüssigkeitschromatographie als rein bezeichnet werden. Das beschriebene Verfahren ermöglicht die Applikation verschiedener Hefemutanten, die die Fähigkeit der Produktion der übrigen Zwischenprodukte der Hämsynthese besitzen.