

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

87664

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 22.06.73 (P. 163530)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 01.02.75

Opis patentowy opublikowano: 15.12.1976

MKP C12k 1/02

Int. Cl². C12K 1/02

CZYTELNICZKA

Urząd Patentowy
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Danuta Kotiuszko, Halina Morawska, Krystyna Strzeżek,
Mieczysław Pikała, Andrzej Rafalski, Kazimierz Czarny,
Zygmunt Zaczynski
Uprawniony z patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego, Warszawa (Polska)

Sposób otrzymywania mutantów *Streptomyces noursei* var. polifungini o zwiększonej zdolności wytwarzania polifunginy

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania mutantów produkcyjnych, w szczególności prostego i szybkiego sposobu selekcji mutantów promieniowca *Streptomyces noursei* var. polifungini o wielokrotnie zwiększonej zdolności do biosyntezy polifunginy.

Dotychczas znane metody selekcji mutantów produkcyjnych, zarówno grzybów, jak i promieniowców, wytwarzających antybiotyki, polegają na losowej selekcji klonów, otrzymywanych z zarodników poddanych działaniu czynników mutagenicznych. Dla uzyskania mutantów o wyższej zdolności wytwarzania antybiotyku koniecznym jest przebadanie, metodą hodowli podpowierzchniowej, ilości klonów rzędu 10^3 – 10^4 .

Sposób ten jest bardzo uciążliwy i pracochłonny, gdyż wymaga wielokrotnych mutacji oraz selekcji i jakkolwiek wprowadzono pewne modyfikacje (Stauffer J.F. i in. — Develop. Ind. Microbiol., 7 (1968), 104, Sermoniti G. — Genetics of Antibiotic-producing Microorganisms, Wiley-Interscience, London, New York, Sydney, Toronto (1969); Woodruff H.B. — Genetics of Industrial Microorganisms, 1st International Symposium (1970), str. 102) nie zawsze uzyskuje się oczekiwane wyniki we względnie krótkim czasie.

Według założeń teoretycznych, dotyczących mechanizmu regulacji u drobnoustrojów biosyntezy metabolitów pierwszorzędowych, jednym ze sposobów otrzymywania szczepów produkcyjnych do biosyntezy aminokwasów jest indukowanie mutacji powrotnych u mutantów auktotroficznych, to jest niezdolnych do syntezy jednego lub więcej aminokwasów oraz selekcja rewertantów typu supresorowego (Cohen G.N. — Annual Review of Microbiology (1965), str. 105).

W odniesieniu do antybiotyków, metabolitów drugorzędowych, których biosynteza u drobnoustrojów kontrolowana jest prawdopodobnie przez podobne mechanizmy regulacji (Malek L. — Biogenesis of Antibiotic Substances, Academic Press, New York, London (1965), str. 11; Demsin A.L. — Ad. Appl. Microbiol., 89 (1966), 1), sposób selekcji rewertantów nie został dotychczas wykorzystany do otrzymywania mutantów produkcyjnych. Zasadniczą trudnością był brak cech oraz podłoży selektywnych, które umożliwiałyby szybki wybór rewertantów.

W sposobie według wynalazku trudność tę ominięto, przyjmując jako pośrednią cechę selektywną różnicę intensywności wzrostu i wytwarzania spor między mutantami, niezdolnymi do biosyntezy antybiotyku, a ich

rewertantami, wytwarzającymi znaczne ilości antybiotyku. Mutanty, niezdolne do biosyntezy antybiotyku, otrzymuje się na drodze mutacji indukowanych. Do otrzymywania ich rewertantów, wytwarzających znaczne ilości antybiotyku, stosuje się mutacje indukowane lub spontaniczne. W pierwszym przypadku, to jest mutacji indukowanych, zawieszę spor mutantów nieaktywnych poddaje się działaniu mutagenów takich, jak np. promienie UV, N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidyna i inne, następnie wysiewa się na podłoże sporulacyjne i w pierwszym etapie selekcjonuje klony obficie zarodnikujące. Następnie sprawdza się ich zdolność do wytwarzania antybiotyku metodą hodowli podpowierzchniowej.

Korzystniejszym wariantem sposobu według wynalazku jest wykorzystanie mutacji spontanicznych. Dla otrzymania rewertantów uprzednio otrzymane mutanty, które całkowicie lub prawie całkowicie utraciły zdolność wytwarzania antybiotyku oraz charakteryzują się słabym wzrostem i słabym wytwarzaniem spor, pasażuje się na podłożu sporulacyjnym. Po każdym pasażu sprawdza się jedynie makroskopowo charakter wzrostu i stopień zarodnikowania, natomiast metodą hodowli podpowierzchniowej sprawdza się tylko te hodowle, które w kolejnym pasażu wykazują dobry wzrost i obfite zarodnikowanie, co przyjęto jako wstępne kryterium rewersji.

W sposobie według wynalazku zarodniki promieniowca *Streptomyces noursei* var. *polifungini* ATCC 21581 lub jego klonów poddaje się działaniu czynników mutagenicznych, selekcjonuje mutanty niezdolne do biosyntezy aktydionu, po czym spośród nich selekcjonuje słabo zarodnikujące mutanty, które całkowicie lub prawie całkowicie utraciły zdolność do biosyntezy polifunginy, pasażuje się je i spośród nich selekcjonuje się dobrze zarodnikujące rewertanty o wysokiej zdolności wytwarzania antybiotyku, które oczyszcza się i stabilizuje.

Selekcję mutantów, niezdolnych do biosyntezy aktydionu, prowadzi się metodą chromatograficzną. Spośród mutantów, niezdolnych do biosyntezy aktydionu, selekcjonuje się metodą oceny makroskopowej słabo zarodnikujące mutanty, spośród których metodą hodowli podpowierzchniowej selekcjonuje się mutanty, które całkowicie lub prawie całkowicie utraciły zdolność do biosyntezy polifunginy, a następnie pasażuje się je na skosach agarowych z pożywką ziemniaczaną.

Selekcję rewertantów prowadzi się metodą oceny makroskopowej wzrostu i zarodnikowania, a następnie dla szczepów dobrze zarodnikujących sprawdza się zdolność wytwarzania polifunginy metodą hodowli podpowierzchniowej. Wyselekcjonowane rewertanty oczyszcza się metodą rozsiewu zarodników i selekcji wysokoaktywnych i stabilnych klonów.

Przykład 1. Otrzymywanie mutantów, niezdolnych do biosyntezy antybiotyku. Dla uzyskania mutantów, niezdolnych do biosyntezy antybiotyków, stosowano szczep dziki lub wybrany klon promieniowca *Streptomyces noursei* var. *polifungini* ATCC 21581, wytwarzając polifunginę. Przesączoną przez bibułę chromatograficzną Whatman'a nr 2, zebraną z 14 dniowej hodowli na pożywce agarowej zawieszę spor, naświetlano promieniami UV o długości fali 2800 Å. Czas i warunki naświetlania dobierano tak, aby uzyskać przeżywność rzędu do 0,1–1,0%. Naświetloną zawieszę wysiewano w odpowiednim stężeniu na pożywkę agarową na płytkach Petrie'go tak, aby po 14 dniach inkubacji w temperaturze 28°C otrzymać poniżej 10 kolonii, równomiernie rozmieszczonych na powierzchni agaru.

Wstępnym kryterium oceny efektywności działania mutagenu było określenie częstości mutacji w kierunku utraty zdolności do wytwarzania aktydionu, antybiotyku wytwarzanego przez szczep dziki równolegle z polifunginą. W tym celu wykorzystano szybką metodę chromatografii bibułowej wydzielonych przez kolonie promieniowca do pożywki agarowej antybiotyków. Analizę chromatograficzną prowadzono, jak następuje. Na paski bibuły Whatman nr 1 nakładano w miejscu startu słupki agarowe, wycięte wraz z kolonią z hodowli naświetlonych spor. Po około 30 minutach słupki agarowe usuwano, a paski bibuły umieszczano w komorze chromatograficznej. Chromatogramy rozwijano w układzie octan etylu nasycony wodą, w ciągu 6 godzin. Stosowano chromatografię zstępującą. Chromatogramy po rozwinięciu wywoływano metodą bioautografii wobec drobnoustroju testowego *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Wartość R_f dla aktydionu wynosiła 0,85, podczas gdy strefa zahamowania wzrostu, wywołana działaniem polifunginy, znajdowała się w punkcie startu. Do dalszych prac pozostawiono tylko te kolonie, które utraciły zdolność wytwarzania aktydionu (brak strefy zahamowania wzrostu o R_f 0,85).

W tablicy I przytoczono dane częstości mutacji w kierunku utraty zdolności wytwarzania aktydionu pod wpływem działania promieni UV. Częstość mutacji klonu 13 R promieniowca *Streptomyces noursei* var. *polifungini* ATCC 21581.

T a b l i c a I

Doświadczenie	% przeżycia po działaniu promieni UV	Ilość przebadanych kolonii	Ilość znalezionych mutantów	% mutantów które utraciły zdolność wytwarzania aktydionu
1	1	326	17	5,1
2	0,2	348	45	12,9
3	0,1	326	50	15,3

Zdolność wytwarzania polifunginy u mutantów tych sprawdzono metodą dwuetapowej hodowli podpowierzchniowej. Zarodnikami z kolonii mutantów szczepiono skosy agarowe z pożywką z wyciągiem ziemniaczanym i glukozą, po czym umieszczono je w termostacie o temperaturze 28°C na okres 14 dni.

Hodowlę podpowierzchniową etapu posiewowego prowadzono na pożywce płynnej w kolbach stożkowych o objętości 500 ml, zawierających po 50 ml pożywki o następującym składzie: glukoza czysta – 2,0%; azotan amonowy cz. – 0,5%; WNK (wyciąg namokowy kukurydzy) suchej masy – 1,0%; węglan wapniowy cz. – 0,5%; woda wodociągowa – do 100%. Pożywkę wyjałowiono w autoklawie przez przeciąg 30 minut w temperaturze 117°C, a po ostudzeniu szczepiono zarodnikami mutantów z hodowli na skosach agarowych z pożywką z wyciągiem ziemniaczanym i glukozą. Hodowlę podpowierzchniową etapu posiewowego prowadzono na trzęsawce obrotowej o 220 obrotach/minutę, w pomieszczeniu termostatowym o temperaturze 28°C w ciągu 42 godzin.

Hodowlę podpowierzchniową etapu produkcyjnego prowadzono na pożywce płynnej w kolbach stożkowych o objętości 500 ml, zawierających po 30 ml pożywki o następującym składzie: olej sojowy surowy – 3,0%; WNK 50% suchej masy – 1,0%; drożdże suszone browarnicze – 0,25%; siarczan amonowy techniczny – 0,4%; węglan wapniowy techniczny – 0,8%; woda wodociągowa do 100%. Pożywkę wyjaławiano w autoklawie przez 30 minut w temperaturze 117°C, a po ostudzeniu do każdej kolby dodawano, w sposób jałowy, materiał posiewowy z hodowli podpowierzchniowej etapu posiewowego w ilości 5% w stosunku do ilości pożywki w kolbie. Hodowlę etapu produkcyjnego prowadzono na trzęsawce obrotowej o 220 obrotach/minutę, w pomieszczeniu termostatowym o temperaturze 28°C w ciągu 120 godzin. Zawartość polifunginy w brzeczce określano znaną metodą spektrofotometryczną.

Postępując zgodnie ze sposobem według wynalazku, średnio dla uzyskania 20 mutantów, które utraciły zdolność wytwarzania polifunginy, wystarczało przebadanie metodą hodowli podpowierzchniowej 100 mutantów, wyselekcjonowanych metodą chromatograficzną.

Przykład II. Otrzymywanie wysokoaktywnych i stabilnych klonów rewertantów. Dla otrzymania rewertantów, wytwarzających znaczne ilości polifunginy, stosowano mutanty, które całkowicie straciły zdolność wytwarzania aktydionu, całkowicie lub prawie całkowicie utraciły zdolność wytwarzania polifunginy oraz charakteryzujące się słabym wzrostem i słabym zarodnikowaniem. Mutanty takie pasażowano około 10-krotnie na pożywkę agarową i po każdym pasażu sprawdzano makroskopowo intensywność wzrostu i zarodnikowania. Szczepy, które w kolejnym pasażu wykazywały dobry wzrost i obfite zarodnikowanie, co jest wstępnym kryterium rewersji, poddawano kontroli metodą dwuetapowej hodowli podpowierzchniowej, jak w przykładzie I. Wyselekcjonowane w ten sposób rewertanty charakteryzowały się dobrym wzrostem, obfitym zarodnikowaniem i wytwarzały znaczne ilości polifunginy.

Otrzymane populacje szczepów rewertantów poddawano oczyszczaniu w celu otrzymania wysokowydajnych jednorodnych klonów, które następnie stabilizowano.

Sposób postępowania przedstawiono przykładowo w tablicy II.

T a b l i c a II

Sposób postępowania	Szczepy i jego charakterystyka	Ilość polifunginy w j/ml
	Klon 13R <i>Streptomyces noursei</i> var. polifungini ATCC 21581 wytwarzający aktydion, wykazujący	17000

	dobry wzrost, obfite zarodnikowanie, niską czynność układu enzymatycznego aktywującego octan i propian do acetylo-CoA i propionilo-CoA,	
Mutacje indukowane – promienie UV, chromatografia kolumn, selekcja mutantów, nie wytwarzających aktydionu	Mutant 851/26, nie wytwarzający aktydionu, wykazujący słaby wzrost, słabe zarodnikowanie, wysoką czynność układu enzymatycznego, aktywującego octan i propionian do acetylo-CoA i propionilo-CoA przy znacznie niższej, niż u szczepu dzikiego, zdolności do syntezy malonianu i metylomalonianu.	180
Mutacja spontaniczna około 10 pasażów na pożywce agarowej, makroskopowa kontrola wzrostu i zarodnikowania, kontrola wytwarzania polifunginy metodą dwuetapowej hodowli podpowierzchniowej, selekcja rewertantów wysokoaktywnych.	Rewertant-R851/26, nie wytwarzający aktydionu, wykazujący bardzo dobry wzrost, obfite zarodnikowanie, wysoką czynność obu typów układów enzymatycznych, aktywujących jednostki budulcowe polifunginy	34000
Oczyszczanie i stabilizacja rewertantów – rozsiew zarodników i izolowanie około 100 klonów, 3-krotne pasażowanie klonów na pożywce agarowej, kontrola wytwarzania polifunginy metodą dwuetapowej hodowli podpowierzchniowej, selekcja najbardziej aktywnego i stabilnego klonu.	Klon R851/26/77, nie wytwarzający aktydionu, wykazujący duży wzrost i obfite zarodnikowanie.	64000

Postępując według przedstawionej tabeli, otrzymano 15 stabilnych klonów rewertantów o zwiększonej zdolności wytwarzania polifunginy, tj. wytwarzających 64000–74000 jednostek polifunginy w 1 ml hodowli.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania mutantów *Streptomyces noursei* var. polifungini o zwiększonej zdolności wytwarzania polifunginy, z n a m i e n n y t y m, że zarodniki promieniowca *Streptomyces noursei* var. polifungini ATCC 21581 lub jego klonów poddaje się działaniu czynników mutagenicznych, selekcjonuje mutanty, niezdolne do biosyntezy aktydionu, po czym spośród nich selekcjonuje słabo zarodnikujące mutanty, które całkowicie lub prawie całkowicie utraciły zdolność do biosyntezy polifunginy, pasażuje się je i spośród nich selekcjonuje dobrze zarodnikujące rewertanty, które oczyszcza się i stabilizuje, a następnie selekcjonuje stabilne klony wysokoprodukcyjnych rewertantów.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że selekcję mutantów, niezdolnych do biosyntezy aktydionu, prowadzi się metodą chromatograficzną.

3. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że selekcję słabo zarodnikujących mutantów, które całkowicie lub prawie całkowicie utraciły zdolność do biosyntezy polifunginy, prowadzi się metodą hodowli podpowierzchniowej.

4. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że pasażowanie słabo zarodnikujących mutantów, które całkowicie lub prawie całkowicie utraciły zdolność do biosyntezy polifunginy, prowadzi się na skosach agarowych z pożywką ziemniaczaną.

5. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że selekcję dobrze zarodnikujących rewertantów prowadzi się metodą oceny makroskopowej wzrostu i zarodnikowania.

6. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że oczyszczanie i stabilizację rewertantów prowadzi się metodą rozsiewu zarodników i selekcji wysokoaktywnych klonów w hodowli podpowierzchniowej, porównując ich zdolność wytwarzania polifunginy z aktywnością szczepu wyjściowego.