

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY 90102

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 14.05.74 (P. 171069)

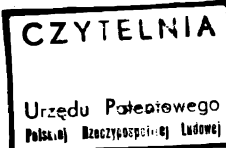
Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 02.05.75

Opis patentowy opublikowano: 30.10.78

MKP C12k 1/02

Int. Cl². C12K 1/02



Twórcy wynalazku: Marian Tyc, Teodora Kadzikiewicz

Uprawniony z patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego,
Warszawa (Polska)

Sposób otrzymywania mutantów o zwiększonej zdolności wytwarzania antybiotyków polipeptydowych

Przedmiotem wynalazku jest prosty sposób otrzymywania mutantów o zwiększonej zdolności do biosyntezy antybiotyków polipeptydowych, w szczególności wysokoaktywnych mutantów drobnoustrojów tworzących endospory (przetrwalniki).

W opisie patentowym nr 66255 podany jest sposób otrzymywania mutantów o zwiększonej zdolności wytwarzania antybiotyków z grupy polipeptydów, polegający na selekcji mutantów, niezdolnych do asymilacji aminokwasów, biorących udział w syntezie antybiotyku. Istota tego wynalazku polega na uszkodzeniu w komórkach drobnoustroju, na drodze indukowanej mutacji, układów enzymatycznych, odpowiadających za przemianę kataboliczną aminokwasów, tworzących cząsteczkę antybiotyku oraz na prostym sposobie różnicowania poszukiwanych mutantów.

Obecnie stwierdzono, że w przypadku bakterii przetrwalnikujących, opierając się na innych niż wyżej wymienione kryteriach, można otrzymywać w prosty i szybki sposób mutanty o wysokiej zdolności wytwarzania antybiotyków polipeptydowych.

Biosynteza antybiotyków polipeptydowych rozpoczyna się po zakończeniu fazy logarytmicznego wzrostu drobnoustroju i maksymalne jej nasilenie przypada na fazę stacjonarną wzrostu. W tej samej fazie wzrostu i w tych samych warunkach drobnoustroje przetrwalnikujące przechodzą w stadium sporogenezy, kończące się ukształtowaniem endospory (przetrwalnika).

Według dotychczasowego piśmiennictwa naukowego przyjmuje się, że istnieje ścisły związek między biosyntezą antybiotyków polipeptydowych i sporogenezą.

W toku badań własnych nad biosyntezą antybiotyków polipeptydowych, wytwarzanych przez szczepy z rodzaju *Bacillus*, stwierdzono, że aktywność antybiotyczna szczepów nie jest zależna od wytwarzania endospor. Stwierdzenie tego faktu, przyczyniło się do opracowania prostego i szybkiego sposobu selekcji wysokoaktywnych mutantów, wytwarzających antybiotyki polipeptydowe, opierającego się na racjonalnej ingerencji w procesy komórkowe drobnoustroju.

W sposobie według wynalazku wydziela się spośród dużej liczby komórek indukowane mutanty z blokiem genetycznym na szlaku sporulacji. W biosyntezie antybiotyków polipeptydowych i sporogenezie istotne znaczenie mają aminokwasy, z których tworzy się cząsteczka antybiotyku i które są podstawowym składnikiem w procesie tworzenia endospory (np. płaszcz endospory składa się z kilku warstw białkowych). Obydwa procesy, przebiegając w tej samej fazie wzrostu, czerpią materiał budulcowy z tej samej puli metabolicznej aminokwasów. Indukcja bloku genetycznego, wyrażającego się zahamowaniem procesu sporulacji, stwarza korzystne warunki do zwiększenia puli aminokwasowej w komórce drobnoustroju i tym samym sprzyja intensyfikacji biosyntezy antybiotyku polipeptydowego.

Sposób według wynalazku polega na tym, że komórki drobnoustroju poddaje się działaniu czynnika mutagennego (np. promieni nadfioletowych, nitrozoguanidyny, iperytu azotowego), celem wywołania mutacji genów kontrolujących proces sporulacji, po czym wysiewa się zawiesinę na płytce Petri'ego z agarem hodowlanym tak, aby wystąpił wzrost w postaci pojedynczych kolonii, inkubuje w termostacie i spośród wyrosłych kolonii selekcjonuje mutanty sporulacyjne metodą makroskopową, mikroskopową lub metodą wysiewu po uprzednim ogrzaniu hodowli w kąpeli wodnej o temperaturze 70°C w ciągu 20 minut.

W wyniku tak przeprowadzonej selekcji otrzymuje się małą grupę populacji, stanowiącą drobny odsetek (rzędu około 10^{-3}) kolonii, wyrosłych z komórek, poddanych działaniu mutagenu. Wyizolowane mutanty poddaje się dalszej selekcji, polegającej na ocenie ich zdolności do biosyntezy antybiotyku metodą fermentacji w kolbach na trzęsawce.

Różnicowanie mutantów sporulacyjnych (asporogennych i oligosporogennych), stanowiących potencjalne źródło szczepów o zwiększonej zdolności wytwarzania antybiotyków polipeptydowych, można przeprowadzać różnymi sposobami. U większości szczepów rodzaju *Bacillus*, które wytwarzają większość poznanych antybiotyków polipeptydowych, skuteczna jest metoda makroskopowa, polegająca na obserwacji wyglądu kolonii. Mutanty sporulacyjne na agarze hodowlanym tworzą kolonie przezroczyste i bezbarwne, istotnie różniące się od kolonii szczepu wyjściowego.

W przypadku drobnoustrojów, u których nie obserwuje się zróżnicowania morfologicznego kolonii, izoluje się pojedyncze kolonie do płynnej pożywki sporulacyjnej i po 48–72 godzinnej inkubacji ogrzewa się hodowle w kąpeli wodnej o temperaturze około 70°C celem zabicia komórek wegetatywnych i następnie wysiewa się na agar odżywczy. Te populacje, które nie wyrastają w ogóle po ogrzaniu lub tworzą nieliczne kolonie, poddaje się dalszej selekcji. Korzystnym wariantem tej metody jest wstępna ocena zdolności sporulacji poszczególnych kolonii, dokonywana na podstawie obrazu mikroskopowego preparatów, barwionych zielenią malachitową (na endospory).

Wysokoaktywne mutanty, wytwarzające antybiotyki z grupy polipeptydów, otrzymane sposobem według wynalazku wykazują stabilność pod względem cechy wytwarzania antybiotyku, łatwa jest ich hodowla i są użyteczne w procesie produkcji antybiotyków polipeptydowych. Kilkakrotne pasażowanie i przechowywanie hodowli na agarze w ciągu kilku tygodni w temperaturze 2°–4°C, jak również przechowywanie w postaci zliofilizowanej, nie wpływało na obniżenie aktywności antybiotycznej wyizolowanych wysokoaktywnych mutantów.

Dalsze szczegóły, dotyczące sposobu postępowania znajdują się w przykładach, które służą do objaśnienia, ale nie ograniczają wynalazku.

Przykład 1. Otrzymywanie mutantów szczepu *Bacillus licheniformis* NCIB 8874 o zwiększonej zdolności wytwarzania bacytracyny.

Selekcji poddano aktywny szczep *Bacillus licheniformis*, który w hodowli trzęsawkowej wytwarzał około 230 j/ml (1 j = $\approx$ 20 mcg) bacytracyny.

W celu otrzymania poszukiwanych mutantów zawiesinę szczepu wyjściowego poddaje się działaniu promieni nadfioletowych w dawce, wywołującej inaktywację komórek w 99,0–99,9%. Zawiesinę bakterii przygotowuje się z hodowli na bulionie, będącej w fazie logarytmicznego wzrostu. Osad bakterii, zebrany przez odwirowanie, przemywa się trzykrotnie jałowym 0,9% roztworem NaCl. Po dokładnym zhomogenizowaniu zawiesinę, zawierającą około 10^8 komórek/ml stosuje się do doświadczenia.

Naświetloną zawiesinę wysiewa się na płytce Petri'ego z agarem zwykłym w takim rozcieńczeniu, aby po 72 godzinnej inkubacji w temperaturze 36°C wystąpił wzrost w postaci pojedynczych kolonii. Po tym czasie obserwuje się na płytkach zróżnicowanie kolonii. Poszukiwane mutanty tworzą kolonie bezbarwne i przezroczyste, natomiast kolonie szczepu wyjściowego są nieprzezroczyste i beżowe. Z płytek izoluje się kolonie przezroczyste na agary skośne, inkubuje w 34°C w ciągu 42 godzin i następnie określa się ich aktywność antybiotyczną i zdolność do sporulacji według niżej podanych schematów.

Określenie aktywności antybiotycznej. Aktywność antybiotyczną otrzymanych mutantów sprawdza się metodą fermentacji w kolbach na trzęsawce. Wszystkie doświadczenia przeprowadza się w tych samych

warunkach, w ten sam sposób i na pożywkach o jednakowym składzie. W każdej serii doświadczeń prowadzi się fermentację kontrolną przy użyciu szczepu wyjściowego, co pozwala na dokładne porównanie aktywności badanych mutantów z aktywnością szczepu wyjściowego.

Sprawdzenie zdolności sporulacji. Wyizolowanymi populacjami szczepi się płynne podłoże sporulacyjne i inkubuje 48–72 godzin w temperaturze 36°C. Otrzymane hodowle ogrzewa się w kąpeli wodnej o temperaturze 70°C w ciągu 20 minut i następnie wysiewa na podłoże agarowe. Mutanty asporogenne po ogrzaniu nie wyrastają w ogóle, a mutanty oligosporogenne wykazują wzrost w postaci nielicznych kolonii.

Postępując według opisanego schematu wyizolowano 32 mutanty sporulacyjne, wśród których znaleziono 4 mutanty (3 asporogenne i 1 oligosporogenne), wytwarzające od 50 do 75% więcej bacytracyny w porównaniu ze szczepem wyjściowym.

Przykład II. Otrzymywanie mutantów *Bacillus subtilis* o zwiększonej zdolności wytwarzania bacytracyny.

Do selekcji użyto aktywnego szczepu *Bacillus subtilis* IA–L, wytwarzającego w hodowli na trzęsawce około 250 j/ml bacytracyny.

Młoda sześciogodzinna hodowla na bulionie szczepu *Bacillus subtilis* odwirowuje się, trzykrotnie przemycia się jałowym 0,9% roztworem NaCl i otrzymany osad bakteryjny zawiesza w jałowym buforze tris (2-amino-2-hydroksymetylo-propanodiol-1,3) o wartości pH = 7. Tak przygotowaną zawiesinę, zawierającą około 10^8 komórek/ml, poddaje się działaniu nitrozoguanidyny w dawce, wywołującej inaktywację komórek w około 99%. Doświadczenie prowadzi się w temperaturze 2–4°C. Po ekspozycji zawiesinę odwirowuje się, osad zawiesza w 0,9% roztworze NaCl i wysiewa na podłoże agarowe tak, aby po 48 godzinach inkubacji w temperaturze 34°C wystąpił wzrost w postaci pojedynczych kolonii. Z pojedynczych kolonii, oznaczonych numerami, przygotowuje się preparaty barwione zielenią malachitową i obserwuje w mikroskopie występowanie przetrwalników bakteryjnych. Koloniami, u których nie stwierdza się przetrwalników, szczepi się płynne podłoże sporulacyjne i inkubuje w temperaturze 36°C w ciągu 48–72 godzin. Otrzymane hodowle ogrzewa się w łaźni wodnej o temperaturze 70°C w ciągu 20 minut i następnie wysiewa na podłoże agarowe, korzystnie na małe sektory, wyznaczone na płytce Petri'ego. Te kolonie, które po ogrzaniu nie wykazują w ogóle wzrostu lub tworzą tylko nieliczne kolonie izoluje się na agary skośne i po inkubacji 42 godzinnej w temperaturze 34°C sprawdza się ich aktywność antybiotyczną według schematu, podanego w przykładzie I.

W wyniku selekcji, przeprowadzonej w wyżej podany sposób, wyizolowano 19 mutantów, wśród których stwierdzono 2 populacje o zwiększonej ponad 60% zdolności wytwarzania bacytracyny w porównaniu ze szczepem wyjściowym.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania mutantów szczepów z rodzaju *Bacillus* o zwiększonej zdolności wytwarzania antybiotyków polipeptydowych przez działanie czynników mutagennych, z n a m i e n n y t y m, że zawiesinę drobnoustroju szczepu przetrwalnikującego wysiewa się po działaniu czynników mutagennych na podłoże agarowe, inkubuje w termostacie i spośród wyrosłych kolonii selekcjonuje makroskopowo, mikroskopowo oraz metodą wysiewu po uprzednim zabiciu komórek wegetatywnych, mutanty asporogenne i oligosporogenne, których aktywność antybiotyczną porównuje się w znany sposób metodą fermentacji z aktywnością szczepu wyjściowego.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że zawiesinę szczepu wyjściowego, otrzymaną w hodowli w fazie logarytmicznego wzrostu, poddaje się działaniu czynników mutagennych w dawce, wywołującej inaktywację komórek.

3. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że jako czynniki mutagenne, w odniesieniu do otrzymywania mutantów asporogennych i oligosporogennych o zwiększonej zdolności wytwarzania antybiotyku, stosuje się korzystnie promienie nadfioletowe i/lub nitrozoguanidynę.

4. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że po inkubacji selekcjonuje się wyrosłe kolonie, charakteryzujące się odmiennymi od szczepu wyjściowego cechami morfologicznymi, tworzące mutanty asporogenne.

5. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że selekcję mutantów przeprowadza się wśród płynnych hodowli, które po ogrzaniu w temperaturze, zabijającej komórki wegetatywne, nie wykazują zdolności wzrostowych.