

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

O P I S P A T E N T O W Y 104829

**Patent dodatkowy
do patentu _____**

Zgłoszono: 24.01.77 (P. 195535)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 31.07.78

Opis patentowy opublikowano: 01.12.1979

Int. Cl.². C12K 1/02

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Barbara Ostrowska-Krysiak, Zbigniew Ruczaj, Barbara Krawczyk, Leonard Karabin, Lidia Pass, Małgorzata Gurkau-Malecha, Jadwiga Wolf, Marlena Lewandowska, Andrzej Miernik, Danuta Sikora, Anna Sokół, Marek Szymczak, Aleksandra Wdowiak, Ewa Załuska

Uprawniony z patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego, Warszawa, Polska;
Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”, Warszawa (Polska)

Sposób otrzymywania mutantów produkcyjnych streptomyces erythreus, charakteryzujących się zdolnością wytwarzania głównie erytromycyny A i opornością na działanie aktynofagów

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania mutantów produkcyjnych, a w szczególności prostego sposobu selekcji wysokowydajnych mutantów promieniowca *Streptomyces erythreus*, charakteryzujących się zdolnością do wytwarzania głównie erytromycyny A i opornością na działanie aktynofagów.

Dotychczas stosowane metody selekcji promieniowców producentów antybiotyków uwzględniają losową kontrolę populacji po działaniu czynników mutagennych. Technika ta jest jednak uciążliwa, ponieważ wymaga każdorazowego przebadania metodą hodowli podpowierzchniowych, dużej liczby 10^3 – 10^4 klonów, dając szanse uzyskania mutantów, zmienionych tylko pod względem jednej cechy, to jest zdolności wytwarzania pożądanego antybiotyku.

Znane udoskonalenia tej metody, a wśród nich Stauffer'a J.F. i in. – Develop. Ind. Microbiol. 104/1966/, Sermoni G. – Genetics of Antibiotic – producing Microorganisms, Wiley – Interscience, London, /1969/, Woodruff'a H.B. – Genetics of Industrial Microorganisms, 1st International Symposium 102/1970/, D Kotiuzko i in., opis patentowy nr 87664, nie pozwalają jednak na selekcjonowanie w sposób ukierunkowany mutantów o cechach, decydujących o jednorodności otrzymanej substancji oraz równocześnie odpornych na działanie aktynofagów.

Dotychczas stosowane w produkcji erytromycyny mutanty wytwarzają obok erytromycyny A również erytromycynę B i erytromycynę C, które są produktami pośrednimi. Pozbycie się niepożądaney erytromycyny B możliwe jest na drodze doboru odpowiednich warunków procesu fermentacji, natomiast usunięcie erytromycyny C wymaga interwencji genetycznej u *Streptomyces erythreus*. Wprawdzie wiadome było, że w przekształceniu erytromycyny C do erytromycyny A bierze udział grupa metylowa, której dawcą jest metionina, jednak dotychczas nie stosowano w produkcji erytromycyny mutantów o odpowiednio zmienionym metabolizmie metioniny.

W pracach nad uzyskaniem odpowiednich mutantów, zdolnych do wytwarzania erytromycyny A, nie zanieczyszczonej erytromycyną C, okazało się właściwe prowadzenie selekcji w kierunku metioninozależności

szczerpów *S.erythreus*, a następnie uzyskanie mutantów powrotnych, u których w wyniku mutacji supresorowej uzyskuje się cechę zwiększonej aktywności syntezy metioniny, niewrażliwości na metioninę, a także zwiększonej zdolności do biosyntezy erytromycyny i zwiększonej zdolności do przekształcania erytromycyny C do erytromycyny A.

Wprowadzenie do tych mutantów cechy oporności na niszczące działanie aktynofagów umożliwia stosowanie ich również w okresach zagrożeń infekcjami wirusowymi, niszczącymi hodowle produkcyjne.

Sposób postępowania według wynalazku obejmuje dobór metod, pozwalających na selektywny wybór mutantów do produkcji erytromycyny, charakteryzujących się wymienionymi wyżej właściwościami.

W sposobie według wynalazku wyróżnia się etapy przygotowania mutantów w następującej kolejności:

- indukowanie zmienności szczepu przy użyciu czynników mutagenizujących,
- selekcja wśród mutagenizowanej populacji mutantów metioninozależnych z blokiem metabolicznym w końcowym stadium biosyntezy aminokwasu,
- indukowanie mutacji powrotnych u metionino-zależnych szczepów – otrzymywanie rewertantów,
- selekcja mutantów fagoopornych, mających wszystkie wymienione wyżej właściwości łącznie z cechą niewrażliwości na infekcję fagową.

Dla każdego z wymienionych etapów postępowania stosuje się metody kontrolne, a szczególnie w odniesieniu do właściwości uzyskanych mutantów, dotyczących zdolności przekształcania erytromycyny C do erytromycyny A, fagooporności i wydajności procesu biosyntezy.

Sposobem według wynalazku indukowanie zmienności prowadzi się przez poddanie zawiesiny zarodników szczepu macierzystego *S.erythreus* działaniu mutagenów, np. promieni UV i/lub N⁷-metylo-nitro-N⁷-nitrozoguanidyny i zmutagenizowaną zawiesinę wysiewa się na podłoże, zawierające zestaw aminokwasów. Po inkubacji wyrosnięte kolonie z płytki replikuje się na analogiczne podłoże, nie zawierające jedynie metioniny. Technika ta pozwala identyfikować mutanty metionino-zależne. Kolonie tych mutantów poddaje się dalszej kontroli, w tym zdolności do biosyntezy erytromycyny, wrażliwości na metioninę i zdolności jej wykorzystywania oraz przekształcania erytromycyny C do erytromycyny A (Tabela I)

T a b e l a I

Selekcja metionino-zależnych auktotrofów

Liczebność populacji wyjściowej	Procent przeżycia po działaniu UV	Liczba kolonii metioninozależnych	Symbol mutantu wybranego
$1,7 \times 10^8$	5	4	<i>S.erythreus met</i> ⁻¹

Wybrany w toku postępowania *S.erythreus met*⁻¹ wytwarzał erytromycynę w granicach do 60% wydajności szczepu macierzystego i charakteryzował się efektywnym przekształcaniem erytromycyny C do erytromycyny A.

Indukowanie mutacji powrotnych prowadzi się u wybranych metioninozależnych szczepów na drodze mutagenizacji j/w, selekcionując mutanty zdolne do wzrostu na podłożu pozbawionym metioniny. Wśród mutantów tych występują szczepy o pożądanym właściwościach, tzn. o zwiększonej, w stosunku do szczepów wyjściowych, zdolności biosyntezy antybiotyku, mające aktywny układ enzymatyczny, katalizujący przemianę erytromycyny C do erytromycyny A oraz zdolność wykorzystywania metioniny do wspomnianego przekształcania.

Tabele II i III wskazują na przydatność wybranego sposobu selekcji dla uzyskania mutantów o zwiększonej zdolności do biosyntezy i efektywnego przekształcania erytromycyn.

T a b e l a II

Selekcja rewertantów szczepu metionino-zależnego

Liczebność populacji szczepu metionino-zależnego	Procent przeżycia po działaniu UV	Liczba rewertantów ogółem	wybranych
$1,5 \times 10^9$	10	47	4

Szczepki otrzymane sposobem według wynalazku np. o symbolach 12/39 i 7/53 w porównaniu ze szczepami wyjściowymi wykazują zwiększoną efektywność przekształcania erytromycyny C do erytromycyny A.

T a b e l a VI

Szczep	efektywność w %
575 (szczep wyjściowy)	30
214 (wysoko wydajny szczep wyjściowy)	70
12/39 (mutant)	100
7/53 (mutant)	100

c) metodą kontroli zdolności przekształcania erytromycyny C do erytromycyny A na podstawie efektywności włączania i przekształcania radioaktywnego związku. (Tabela VII).

T a b e l a VII

aktywność Szczep	SE-1	SE-2	SE-3	SE-4	SE-5
214 wyjściowy	wrażliwy	wrażliwy	wrażliwy	wrażliwy	wrażliwy
7/53 fagooporny	oporny	oporny	oporny	oporny	oporny

Wyselekcjonowane i skontrolowane w opisany sposób mutanty *S.erythreus* ocenia się pod kątem ich przydatności do wysokowydajnej biosyntezy erytromycyny w skali laboratoryjnej i w fermentorach doświadczalnych.

P r z y k ł a d I. Otrzymywanie mutantów auktotroficznych metionino-zależnych.

Z hodowli *S.erythreus* na podłożu o składzie: wyciąg mięsny 1,0 g, wyciąg drożdżowy 1,0 g, pankreatyczny kazeiny 2,0 g, agar 25,0 g, glukoza 1,0 g, woda destylowana 1,0 litr, o pH=7,5, zebrano zarodniki przy pomocy jałowych perełek szklanych i zawieszono w wodzie tak, aby otrzymać zawiesinę o mianie 10^7 . Zawiesinę tę naświetlano lampą UV, emitującą promienie UV o długości $260\mu\text{m}$ w dawce 5000 agarów/ mm^2 . Odpowiednie rozcieńczenia i naświetlanej zawiesiny wysiewano na płytki Petriego, zawierające 20 ml pożywki o składzie podanym powyżej i płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 6 dni. Wśród kolonii, wyrosłych na płytkach, identyfikację metionino-zależnych auktotrofów prowadzono, replikując hodowle z płytek macierzystych przy użyciu krążków welwetowych na płytki z podłożem minimalnym, wzbogaconym aminokwasami z pominięciem metioniny. Skład podłoża minimalnego: KH_2PO_4 —1,0 g, MgSO_4 —0,5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —3,5 g, DL—asparagina 1,5 g, glukoza 5,0 g, woda destylowana 1,0 litr, po sterylizacji dodawano sole: NaCl i CaCl_2 w ilości 0,1 g na litr oraz mikroelementy, a następnie wzbogacano aminokwasami w ilości po 100 mcg/ml. Po 10 dniach inkubacji replik w temperaturze 30°C identyfikowano kolonie metionino-zależnych auktotrofów na płycie macierzystej i izolowano je na podłoże kompletne.

Szczepki metionino-zależne kontrolowano pod względem ich zdolności do biosyntezy erytromycyny i zdolności przekształcania erytromycyny C do erytromycyny A.

P r z y k ł a d II. Otrzymywanie rewertantów.

Z hodowli *S.erythreus* met⁻¹ na podłożu kompletnym, jak w przykładzie I, zebrano zarodniki, zawieszono je w jałowej wodzie, otrzymując zawiesinę o gęstości około 10^7 zarodników/1 ml. Zawiesinę naświetlano promieniami UV w dawce 5000 ergów/ mm^2 i wysiewano po 0,1 ml naświetlonej zawiesiny na płytkę z podłożem minimalnym. Po 12 dniowej inkubacji na podłożu tym wyrastały tylko kolonie rewertantów. Kolonie rewertantów izolowano z płytek i kontrolowano pod względem ich zdolności do biosyntezy erytromycyny A, szczególnie pod względem ich aktywności przekształcania erytromycyny C do erytromycyny A. Uzyskane rewertanty o aktywności 110–120% aktywności szczepu wyjściowego badano pod względem ich zdolności do przekształcania erytromycyny C do erytromycyny A:

1) w hodowlach na podłożach wzbogaconych metioniną Mutanty (rewertanty) posiewano na sektory płytek z podłożem agarowym kompletnym, odpowiednio zawierającym a) 10 mM propanolu/1 litr podłoża oraz b) 10 mM propanolu i 1 mM metioniny/1 litr podłoża.

Tabela III

Charakterystyka wybranych rewertantów

Szczep	Wytwarzanie erytromycyny w %	Zdolność przekształcania erytromycyny C do erytromycyny A
Wyjściowy	100	słaba
Metionino-zależny	60	dobra
Rewertanty	110–120	bardzo dobra

Kontrolę otrzymanych sposobem według wynalazku mutantów prowadzi się:

a) metodą kontroli klonów w teście płytkowo-chromatograficznym, przy czym skład podłoża na płytkach jest zróżnicowany pod względem zawartości metioniny jako efektora przekształcania erytromycyny C do erytromycyny A. Chromatografia odpowiednio przygotowanych hodowli umożliwia kontrolę zdolności wykorzystywania metioniny do wytwarzania czystej erytromycyny A. Testem tym można jednorazowo przebadать kilkadziesiąt klonów,

b) metodą kontroli klonów testem kolbowo-chromatograficznym w hodowlach, wzbogaconych erytromycyną C, w których chromatograficznie kontroluje się jej zanikanie. Test ten umożliwia jednorazowo przebadanie kilkunastu szczepów i wybranie takich, które przekształcają erytromycynę C w sposób najbardziej efektywny.

W przebadanych 150 mutantach *S.erythreus* zdolność przekształcania erytromycyny C do erytromycyny A była zróżnicowana, a uzyskane wyniki pozwalają na przedstawienie grup badanych szczepów (tabela IV)

Tabela IV

Ocena efektywności przekształcania erytromycyny C do erytromycyny A	Liczba szczepów %
Całkowite przekształcenie (100%)	36
Częściowe przekształcenie (70%)	17
Słabe przekształcenie (30%)	17
Brak przekształcenia (0%)	30

Tabela V wskazuje na różnice zawartości erytromycyny C w hodowli mutantów i szczepu wyjściowego ocenione w oparciu o ilość prekursorów radioaktywnych włączanych w czasie procesu biosyntezy.

Tabela V

Mutant <i>S.erythreus</i>	Pole erytromycyn impulsy/min/ml	%	Erytromycyna C impulsy/min/ml	%
214	245276	100	55089	25
12/39	295388	100	15280	5,4
7/53	203145	100	9964	4,8

Na podstawie przedstawionych w tabeli V wyników stwierdza się pięciokrotnie zmniejszenie radioaktywności w erytromycynie C, uzyskanej z hodowli mutantów, w porównaniu z hodowlą szczepu wyjściowego, co świadczy o zwiększonej zdolności metabolizowania erytromycyny C do erytromycyny A.

Przygotowanie mutantów, mających wymienione wyżej właściwości oraz właściwość oporności na aktynofagi, prowadzi się z użyciem specyficznego fagalizogenizującego, który dodany do hodowli wybranego mutantu powoduje po określonym okresie inkubacji powstanie klonów, charakteryzujących się opornością na fagi zjadliwe dla *S.erythreus*. Znaczny procent uzyskanych w ten sposób mutantów fagoopornych zachowało uprzednio selekcjonowane właściwości. Korzystnymi właściwościami dla produkcji wyróżniał się szczep o symbolu 7/53.

Fagooporność szczepu 7/53 w porównaniu do szczepu wyjściowego 214 przedstawia tabela VI.

Płytki z hodowlami inkubowano 5 dni, a następnie wycinano z nich bloczki przy pomocy metalowego wyjąłowego korkobora o średnicy 5,5 mm i wysokości 2,8 mm, które umieszczono na 20 minut na zbuforowanych paskach bibuły Whatman 42 o szerokości 8 mm i długości 57 cm w odległości 5 cm od końca paska. W ciągu 20 minut wytworzony przez badane szczepy antybiotyki dyfunduje z bloczka agarowego z hodowlą do bibuły. Po zdjęciu hodowli paski suszono w temperaturze pokojowej, a następnie umieszczono je w szklanej komorze chromatograficznej – Chropa (o kształcie walca) z układem rozwijającym (bufor fosforanowy nasycony chloroformem, 1% piperydiny, zobojętnionej do pH = 8,0 lodowatym kwasem octowym (w ten sposób, aby końce pasków znajdowały się około 2 mm poniżej powierzchni układu).

Po 18 godzinach rozwijania paski suszono w temperaturze pokojowej. Wywoływanie chromatogramów przeprowadzano metodą mikrobiologiczną, układając paski na płytę o wymiarach 56 cm×46 cm zakrzepłym podłożem agarowym kompletnym, w którym znajdowały się zarodniki szczepu testowego *Bacillus subtilis* ATCC 6638. Po 18 godzinach inkubacji w temperaturze 33°C identyfikowano strefy zahamowania wzrostu szczepu testowego wobec stref, wywołanych określonymi dawkami preparatów erytromycyny A, B i C.

Porównanie chromatogramów mutantów z podłoża a, w którym wytwarzane są erytromycyny A, B i C oraz z podłoża b, w którym u mutantów o pożądanych właściwościach brak jest strefy, odpowiadającej erytromycynie C, pozwala na wybór mutantów, efektywnie wykorzystujących metioninę do przekształcania erytromycyny C do erytromycyny A.

2) W hodowlach na podłożach, wzbogaconych erytromycyną C.

Do kolb Erlenmayera, zawierających 30 ml podłoża hodowlanego, dodano roztwór jałowy erytromycyny C w takiej ilości, aby stężenie końcowe wynosiło 75–100 mcg/ml hodowli, a następnie dodano 3 ml 48 godzinnej hodowli posiewowej badanego mutantu *S. erythreus* i kolby inkubowano na trzęsawce w temperaturze 32°C. W 24 i 48 godzinie hodowli pobierano próby, odwirowano i przesącz nanoszono na paski bibuły chromatograficznej w ilości 10 µl. Po rozwinięciu, chromatogram wywołymano biologicznie na płytach agarowych. Strefy zahamowania wzrostu, odpowiadające erytromycynie C, mierzono planimetrycznie w znany sposób, określając w procentach zmniejszenie się lub całkowity zanik plamy, odpowiadającej erytromycynie C, w porównaniu z próbą kontrolną hodowli tego samego mutantu, nie zawierającej dodanej erytromycyny C. Dodatkową kontrolę stanowi kolba z podłożem, nie szczepionym hodowlą, a zawierającym identyczną ilość erytromycyny C, jak w próbie właściwej.

3) W hodowlach na podłożach wzbogaconych znakowanym 1^{14}C – propionianem.

Do kolbek Erlenmayera o pojemności 50 ml dodano 5 ml hodowli *S. erythreus* (badanego mutantu), roztwór propionianu sodu, nieznaczony węglem radioaktywnym, w ilości takiej, aby stężenie końcowe wynosiło 150 µg/ml hodowli oraz roztwór 1^{14}C –propionianu sodu, w ilości 10 µCi/ml hodowli i próby inkubowano w wytrząsarce pod wyciągiem. Włączenie radioaktywnego propionianu kontrolowano w 0, 1, 2, 4, 6, 8 godzinie inkubacji, pobierając 1 ml próby i natychmiast oziębiono. Do 1 ml oziębionej próby dodano 1 ml buforu węglanowego o wartości pH=9,5 i natychmiast próbkę poddano działaniu ultradźwięków w dezintegratorze w ciągu 2 minut (aparat o mocy 100 W). Rozbitą hodowlę ekstrahowano 2 ml octanu amylu przez wytrząsanie w ciągu 15 minut. Ekstrakty octanowe, zawierające erytromycyny radioaktywne, po odwirowaniu używano do badań chromatograficznych: na żelu krzemionkowym i na bibule.

Na płytki, pokryte żelą krzemionkowym (firmy Merck), nanosi się ekstrakt octanowy w ilości 50 µl. Płytki rozwija się w układzie rozpuszczalników – chlorek metylu: metanol:benzen:formalina (80:20:20:40). Chromatogramy wywołuje się przez spryskiwanie brzegów płytki odczynnikami do wywoływania erytromycyn, ogrzewając strumieniem powietrza tylko spryskane fragmenty płytki. Przez zeskrobanie żelu z płytki, zdejmując łącznie erytromycyny A, B i C i ekstrahuje się je z żelu metanolem (5 razy po 10 ml). Eluaty zatęża się do objętości 1 ml i przeprowadza się w znany sposób pomiar radioaktywności włączonej do erytromycyn.

Ekstrakty metanolowe, zawierające erytromycyny A, B i C, rozdziela się w znany sposób na poszczególne składniki metodą chromatografii bibułowej (bibuła Whatman W 42, buforowana buforem fosforanowym o pH=8,0) w układzie, zawierającym 0,02 M bufor fosforanowy, wysycony mieszaniną chloroform:pirydyna:kwas octowy (500:5:3). Poszczególne erytromycyny lokalizuje się na paskach w znany sposób metodą radioautografii i metodą biologiczną na płytkach agarowych. Fragmenty pasków, odpowiadające poszczególnym erytromycynom, wycina się, umieszcza w naczynkach pomiarowych i przeprowadza pomiar radioaktywności w znany sposób.

Przykład III. Wprowadzanie fagooporności do wybranych szczepów rewertantów.

Zawiesiną zarodników szczepu rewertanta o symbolu R-11 zaszczepiono pożywkę o składzie: wyciąg namokowy kukurydzy 30,0 g, sacharoza 30,0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4,0 g, CaCO_3 6,0 g, olej sojowy 2,0 g, woda destylowana 1 litr, pH naturalne. Po 24 godzinach inkubacji na trzęsawce obrotowej o 220 rpm w temperaturze

33°C hodowlą tą, w ilości 5%, zaszczepiono pożywkę Waltona o składzie: wyciąg mięsny 10,0 g glukoza 10,0 g, K_2HPO_4 —0,5 g, woda destylowana 1 litr, pH=7,0, dodając faga P-121 tak, aby stosunek komórek promieniowca do cząstek faga wynosił 10 : 1. Po 30 minutach inkubacji z fagiem hodowlę odwirowano, zainfekowane komórki promieniowca przeniesiono do świeżego podłoża Waltona i inkubowano przez 6 godzin, a następnie odwirowano. Odwirowane zlizogenizowane komórki promieniowca inkubowano z surowicą antyfagową o mianie 10^5 (dodając na 1 ml zawiesiny komórek 1 ml surowicy) w temperaturze 37°C przez 30 minut. Następnie odpowiednie rozcieńczenie zawiesiny komórek wysiewano na podłoże agarowe kompletne i inkubowano przez 7 dni w temperaturze 30°C. Wyrósłe klony kontrolowano pod względem fagooporności, zdolności do biosyntezy erytromycyn i zdolności do efektywnej konwersji erytromycyn.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania mutantów produkcyjnych *Streptomyces erythreus*, charakteryzujących się zdolnością wytwarzania głównie erytromycyny A i opornością na działanie aktynofagów, z n a m i e n n y t y m, że szczep produkcyjny poddaje się działaniu mutagenów, selekcjonuje mutanty metioninozależne z blokiem metabolicznym w końcowych stadiach biosyntezy aminokwasu, następnie indukuje u nich mutacje powrotne przez mutagenizację i selekcję mutantów, zdolnych do wzrostu na podłożu pozbawionym metioniny, po czym do otrzymanych rewertantów wprowadza się cechę fagooporności przez lizogenizację odpowiednim fagiem i przeprowadza następną selekcję.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że jako wskaźnik przydatności prowadzi się hodowlę mutantów na podłożach, wzbogaconych metioniną, erytromycyną C i znakowanym propionianem.