

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

66 255

Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 12.V.1970 (P 140 569)

Pierwszeństwo:

Opublikowano: 30.X.1972

Kl. 30h,6

MKP C12k 1/02

UKD

Współtwórcy wynalazku: Marian Tyc, Teodora Kadzikiewicz, Kazimierz Woźniak

Właściciel patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego, Warszawa (Polska)

Sposób otrzymywania mutantów drobnoustrojów o zwiększonej zdolności wytwarzania antybiotyków

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania mutantów drobnoustrojów o zwiększonej zdolności wytwarzania antybiotyków z grupy polipeptydów, takich, jak wionycyna lub bacytracyna.

Postęp w dziedzinie produkcji antybiotyków polega przede wszystkim na wprowadzaniu do produkcji nowych szczepów o zwiększonej aktywności antybiotycznej. W tym celu wykorzystuje się mutanty indukowane, które wytwarzają wielokrotnie większe ilości antybiotyków w porównaniu ze szczepami macierzystymi.

Pojawienie się w obrębie populacji drobnoustroju osobników o zwiększonej aktywności jest związane ze zjawiskiem zmienności której podstawowym źródłem są mutacje. Mutacje spontaniczne i indukowane dostarczają surowego materiału do selekcji szczepów o zwiększonej zdolności wytwarzania antybiotyków. (S. I. Alichanian, Advances in Applied Microbiology 1962, 4.1).

W pierwszym okresie ery antybiotyków selekcja szczepów przemysłowych polegała na poszukiwaniu mutantów spontanicznych. Obecnie metody selekcji obejmują mutację wywołaną czynnikami mutagennymi i następującą po niej selekcję aktywnych mutantów. Pod wpływem działania fizycznych i chemicznych czynników mutagennych zwiększa się w populacji stosunek mutantów o zwiększonej aktywności do ogólnej liczby osobników, co w konsekwencji stwarza większe prawdopodobieństwo znalezienia wartościowego szczepu. Spośród

2

czynników fizycznych szerokie zastosowanie w selekcji drobnoustrojów znalazły promienie jonizujące począwszy od promieni nadfioletowych przez promienie Roentgena, a skończywszy na szybkich elektronach. Spośród chemicznych mutagenów najczęściej stosowane są iperyty azotowe, etylenoimina, siarczan dwuetylowy, kwas azotawy, nitrozoguanidyna i inne.

Znane sposoby selekcji wysokowydajnych mutantów wytwarzających antybiotyki są żmudne, bardzo pracochłonne i wymagają dużych nakładów finansowych. Schemat selekcji przedstawić można następująco: zawiesinę komórek drobnoustroju poddaje się działaniu czynników mutagennych, następnie rozsiewa się komórki na podłożu agarowym, izoluje losowo wybrane kolonie, określa aktywności wyizolowanych populacji metodą fermentacji i dokonuje wyboru mutantu.

Główna trudność selekcji polega na sposobie wykrywania wśród dużej liczby komórek osobników odznaczających się zwiększoną aktywnością. Wąskim gardłem obecnie stosowanej selekcji jest konieczność prowadzenia przez kilka dni fermentacji głębinowej wszystkich wyizolowanych szczepów, celem określenia ich aktywności. W praktyce ocena dużej liczby szczepów pod względem aktywności antybiotycznej jest trudna, ze względu na istnienie wielu czynników wpływających na ostateczny wynik fermentacji (labilność mutantów, warunki fermentacji, błąd metody oznaczenia itd.).

W przypadku szczepów wytwarzających antybiotyki poszukiwania idą w kierunku mutantów charakteryzujących się zmiennością cech ilościowych. Podłożem cech ilościowych są tzw. geny wielokrotne (poligeny), natomiast podłożem cech jakościowych są geny podstawowe (struktury). Selekcja szczepów wytwarzających antybiotyki dotyczy mutantów „ilościowych” które są trudne do wykrycia i istotnie różnią się od mutantów „jakościowych”.

Wysokoaktywne mutanty otrzymuje się na drodze selekcji kilkustopniowej, tzn. z niskowydajnych szczepów selekcjonuje się szczepy o wyższej aktywności, z tych ostatnich o jeszcze wyższej wydajności itd. Krzywa selekcji mutantów spontanicznych i indukowanych odznaczających się zwiększoną aktywnością antybiotyczną wzrasta na początku pracy ze szczepami dzikimi (naturalnymi) i wariantami niskowydajnymi.

W miarę jak drobnoustroj nabywa cech ekonomicznie wartościowych częstotliwość dalszej mutacji w kierunku zwiększonej aktywności spada i selekcja często nie daje praktycznego efektu. Zjawisko to tłumaczy się tym, że w wyniku mutacji wiele loci zostaje zmutowanych i powstają niekorzystne układy, które wielokrotnie zmniejszają częstotliwość pojawienia się nowych wartościowych mutantów. Dalsza selekcja mutantów o zwiększonej aktywności skazana jest wtedy na przypadkowość (I. C. T. Calam: Progress in Industrial Microbiology, 1964, 5, 1. S. I. Alichanian: Advances in Applied Microbiology, 1962, 4, 1.).

Dotychczasowe próby znalezienia prostej metody selekcji, która pozwalałaby na szybkie zróżnicowanie szczepów o dużej aktywności nie dały pozytywnych wyników. Metoda bezpośredniego określania na podłożach stałych właściwości antybiotycznych pojedynczych kolonii wobec drobnoustroju wrażliwego okazała się nieprzydatna w selekcji, gdyż nie stwierdzono współzależności między wielkością strefy zahamowania wzrostu drobnoustroju wzorcowego a zdolnością wytwarzania antybiotyku w podłożu płynnym. Nie powiodły się również próby znalezienia zależności między cechami morfologicznymi a zdolnością wytwarzania antybiotyku. Wykazano także, że uodpornienie szczepów na duże dawki wytwarzanego przez nie antybiotyku nie prowadzi do zwiększenia wydajności.

W toku poszukiwania skutecznej metody, która umożliwiałaby dalszą selekcję wysokowydajnych mutantów wytwarzających antybiotyki z grupy polipeptydów takie jak wiomycyna lub bacytracyna stwierdzono, że można otrzymać w prosty sposób nowe mutanty o zwiększonej aktywności jeżeli spośród dużej liczby kolonii, wyrosłych z komórek poddanych działaniu czynników mutagennych, izoluje się metodą replik takie, które nie mają zdolności lub wykazują ograniczoną zdolność do wykorzystywania z agarowych podłoży syntetycznych aminokwasów lub ich analogów występujących w cząsteczce wytwarzanego przez nie antybiotyku i następnie porównuje się ich aktywność antybiotyczną z aktywnością szczepu wyjściowego.

Sposób według wynalazku polega na tym, że komórki drobnoustroju poddaje się działaniu czynnika

mutagennego (np. iperytu azotowego lub promieni UV) i następnie wysiewa na płytki Petri'ego z agarem hodowlanym tak, aby na płytce wyrosło 50 — 100 kolonii. Po inkubacji kolonie przesiewa się metodą replik na podłoże syntetyczne zawierające jako jedyne źródło azotu aminokwasy korzystnie tworzące łańcuch polipeptydowy w cząsteczce wytwarzanego przez drobnoustroj antybiotyku. Kolonie, które nie wyrastają lub wykazują ograniczony wzrost na podłożu syntetycznym zawierającym dodatek odpowiednich aminokwasów izoluje się z płytek matrycowych na skośne agary hodowlane i inkubuje w termostacie.

W wyniku tak przeprowadzonej selekcji otrzymuje się małą grupę populacji stanowiącą drobny odsetek (np. rzędu 10^{-3}) kolonii replikowanych. Wyizolowane szczepy poddaje się szczegółowym badaniom, gdyż poszukiwane mutanty stanowią tylko pewną część wydzielonej grupy, większość populacji wykazuje zmniejszoną aktywność w porównaniu ze szczepem wyjściowym. Znalezienie mutantów o zwiększonej aktywności, występujących w małej grupie populacji, nie następuje większych trudności. Aktywność wyizolowanych szczepów sprawdza się metodą fermentacji i porównuje z aktywnością szczepu wyjściowego.

Wynalazek objaśniają niżej podane przykłady dotyczące otrzymywania mutantów o zwiększonej zdolności wytwarzania antybiotyków.

Przykład I. Otrzymywanie szczepu o zwiększonej zdolności wytwarzania wiomycyny. Selekcji poddano aktywnego mutantu szczepu *Streptomyces griseus* var. *purpureus*, który wytwarzał w hodowli głębinowej około 2500 j/ml wiomycyny. Próby zwiększenia aktywności tego szczepu znanyymi metodami selekcji nie dały wyniku, chociaż zbadano ponad 1000 populacji otrzymanych z zarodników poddanych działaniu czynników mutagennych. Wyjściowy szczep dobrze asymilował lizynę, argininę, β -alaninę i serynę z agarowych podłoży syntetycznych.

Zarodniki wyjściowego szczepu zebrano z 8-dniowej hodowli na podłożu sporulacyjnym i zawieszono w jałowej wodzie destylacyjnej. Przy pomocy perełek szklanych zawiesinę zarodników dokładnie homogenizowano i następnie sączono przez filtr z waty. Homogenną zawiesinę zawierającą w 1 ml około 10^7 zarodników poddano działaniu iperytu azotowego, w dawkach wywołujących inaktywację zarodników rzędu 99,9%.

Po ekspozycji zawiesinę zarodników wysiewano na płytki Petri'ego z podłożem sporulacyjnym w takim rozcieńczeniu, aby na płytce wyrosło około 70 kolonii. Płytki posiane zawiesiną inkubowano w ciągu 5 dni w temperaturze 28°C i następnie przeprowadzano przesiew kolonii metodą replik na podłoże syntetyczne zawierające lizynę, argininę lub β -alaninę jako jedyne źródło azotu. Po replice płytki inkubowano w temperaturze 28°C i obserwowano wzrost kolonii. Te kolonie, które na podłożu syntetycznym zawierającym aminokwasy nie wyrosły lub wykazywały wzrost znacznie ograniczony, izolowano z płytek matrycowych na skośne agary sporulacyjne i inkubowano w temperaturze 28°C w ciągu 9 dni.

Wyosobnione populacje stanowiły drobny odsetek (około 10^{-8}) replikowanych kolonii. Aktywność antybiotyczną wyizolowanych populacji sprawdzano metodą fermentacji na trzęsawce. Dla celów porównawczych w każdej serii doświadczeń prowadzono fermentację kontrolną przy użyciu szczepu wyjściowego. Wszystkie szczepy hodowano w tych samych warunkach, w ten sam sposób i na pożywkach o jednakowym składzie. Takie ujęcie doświadczenia pozwoliło na przedstawienie aktywności badanych szczepów w procentach w odniesieniu do wydajności szczepu wyjściowego.

W wyniku przeprowadzonej selekcji otrzymano nowe mutanty o zwiększonej aktywności wytwarzania wiomycyny, które równocześnie nie wykazywały zdolności do wykorzystywania jednego lub kilku wymienionych aminokwasów. W przypadku otrzymania mutanta niezdolnego do asymilacji tylko jednego aminokwasu przeprowadzano ponownie selekcję, używając nowego mutanta o zwiększonej aktywności jako szczepu wyjściowego.

Postępując według opisanego sposobu wyizolowano 32 populacje, wśród których znaleziono 3 nowe mutanty o zwiększonej zdolności wytwarzania wiomycyny (5000–6000 j/ml (1 j wiomycyny = 1 mcg wiomycyny).

Przykład II. Otrzymywanie szczepu o zwiększonej zdolności wytwarzania bacytracyny. Do selekcji użyto szczepu z grupy *Bacillus subtilis*, który w hodowli trzęsawkowej wytwarza około 235 j/ml bacytracyny.

Hodowlę szczepu wyjściowego z grupy *Bacillus subtilis* odwirowuje się i bakterie trzykrotnie przemywa się jałowym 0,85% roztworem NaCl. Z przemytych bakterii przygotowuje się homogenną zawiesinę w jałowym 0,85% NaCl zawierającą w 1 ml około 10^8 komórek. Tak przygotowaną zawiesinę bakterii poddaje się działaniu iperytu azotowego stosując dawki wywołujące inaktywację komórek rzędu 99,99%. Po ekspozycji zawiesinę komórek odpowiednio się rozcieńcza i rozprowadza na płytce z agarem hodowlanym tak, aby na płytce wyrosło

około 70 kolonii. Inkubację prowadzi się w temperaturze 35°C w ciągu 2 dni.

Otrzymane hodowle w postaci pojedynczych kolonii przesiewa się metodą replik na podłoże syntetyczne zawierające izoleucynę, serynę, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy lub ornitynę jako jedyne źródło azotu. Po przesiewie płytki inkubuje się w temperaturze 35° w ciągu 2 dni. Kolonie, które na podłożu syntetycznym nie wykazują wzrostu lub mają wzrost wyraźnie ograniczony, izoluje się z płytek matrycowych na skośne agary hodowlane i inkubuje w temperaturze 35°C. Aktywność otrzymanych w ten sposób populacji sprawdza się metodą hodowli na trzęsawce i porównuje z aktywnością szczepu wyjściowego.

Postępując według podanego schematu otrzymano szczep, który nie wykazuje zdolności do asymilacji z podłoża syntetycznego izoleucyny i wytwarza w hodowli trzęsawkowej około 350 j/ml bacytracyny (1 j bacytracyny = 18 mcg bacytracyny), co stanowi zwiększenie aktywności antybiotycznej około 50% w porównaniu ze szczepem wyjściowym.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania mutantów drobnoustrojów o zwiększonej zdolności wytwarzania antybiotyków z grupy polipeptydów takich jak wiomycyna lub bacytracyna przez działanie czynników mutagennych, **znamienny tym**, że komórki drobnoustroju wytwarzającego antybiotyk po zmutowaniu wysiewa się na agarowe podłoże hodowlane, inkubuje w termostacie, wyrosnięte kolonie replikuje na podłoże syntetyczne zawierające jako jedyne źródło azotu aminokwasy, korzystnie tworzące łańcuch polipeptydowy w cząsteczce wytwarzanego przez drobnoustrój antybiotyku, ponownie inkubuje w termostacie, izoluje z płytek matrycowych te kolonie, które nie wyrastają lub mają ograniczony wzrost na podłożu syntetycznym i porównuje się metodą fermentacji aktywność antybiotyczną wyizolowanych populacji z aktywnością szczepu wyjściowego.