

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY PATENTU TYMCZASOWEGO

82443

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu _____

Kl. 30h, 6

Zgłoszono: 19.05.1973 (P. 162684)

Pierwszeństwo: _____

MKP C12k 1/02

Zgłoszenie ogłoszono: 01.06.1974

Opis patentowy opublikowano: 25.11.1975

Twórcy wynalazku: Helena Oberman, Halina Wośko, Ewa Garstka, Jerzy Meller

Uprawniony z patentu tymczasowego: Kutnowskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”,
Kutno (Polska)

Sposób otrzymywania wysokoaktywnych nizynotwórczych populacji mikroorganizmów *Streptococcus lactis*

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania wysokoaktywnych nizynotwórczych populacji mikroorganizmów *Streptococcus lactis* z wyjściowej populacji o słabej aktywności nizynotwórczej.

Według dotychczas znanych sposobów wyizolowanie szczepów nizynotwórczych polega na wydzielaniu frakcji populacji ze środowisk naturalnych bądź na wyizolowaniu klonów metodą rozsiewu na płycie. Otrzymane w ten sposób kultury przechodzą szereg etapów uaktywniania poprzez podłoża płynne i stałe. Jest to jednak sposób mało wydajny, pracochłonny, a przy tym wyniki zależą od przypadku i są często negatywne.

Stwierdzono, że można regenerować aktywność biosyntetyczną szczepu nizynotwórczego w kilkuetapowym procesie kierowanej selekcji przy użyciu czynników chemicznych takich, jak nizyna i N-metylo-N-nitrozo-N'-nitro-guanidyna. Jako materiał wyjściowy zgodnie z wynalazkiem może służyć osłabiona populacja nizynotwórczego szczepu *Streptococcus lactis*, której ulepszenie cech produkcyjnych odbywa się na drodze kierowanej, eliminującej z populacji osobniki o słabszej aktywności nizynotwórczej i prowadzącej do biologicznego wzmocnienia populacji, a zastosowanie N-metylo-N-nitrozo-N'-nitro-guanidyny umożliwia proces indukcji mutacji w populacji drobnoustrojów.

Sposób według wynalazku umożliwia otrzymywanie zmienionych populacji ze szczepu *Streptococcus lactis*, które charakteryzują się wysoką aktywnością nizynotwórczą i dobrą stabilnością produkcyjną w okresie co najmniej trzech miesięcy. Ponadto pozwala na otrzymywanie szczepów produkcyjnych do 2500 jednostek nizyny w 1 ml hodowli w mleku w ciągu przynajmniej 15 generacji. Zgodnie z wynalazkiem hodowlę bakterii nizynowych o osłabionej zdolności biosyntezy nizyny rozmnaża się w podłożu mlecznym do uzyskania początku stacjonarnej fazy wzrostu, następnie po zobojętnieniu mleka do wartości pH około 7,0 oraz po dodaniu cytrynianu sodu oddziela się osad komórek przez wirowanie, przemywa buforem fosforanowym o wartości pH = 7,0, po czym rozтворя w buforze fosforanowym o wartości pH = 7,0 do zawartości biomasy, wynoszącej 0,3–0,5 mg/ml. Uzyskuje się w ten sposób zawiesinę podstawową, do której dodaje się nizynę w ilości zabezpieczającej poziom 200–1000 j/ml, korzystnie około 500 j/ml, po czym przechowuje ją w temperaturze +4°C w ciągu 12 godzin. Po tym czasie dodaje się N-metylo-N-nitrozo-N'-nitro-guanidynę do uzyskania 0,05–1,0 mg/ml, korzystnie 0,5 mg/ml. Zawiesinę bakterii w roztworze nizyny i N-metylo-N-nitrozo-N'-nitro-

ro-guanidyny przetrzymuje się do 150 minut, korzystnie 60 minut, w temperaturze 30°C. Bezpośrednio lub po przechowaniu w temperaturze +4°C w czasie do 12 godzin, pobiera się po 1 ml zawiesiny i przenosi do 9 ml sterylnego buforu ochłodzonego do temperatury +4°C o wartości pH = 7,0. Po dokładnym wymieszaniu materiał biologiczny wysiewa się na agarowe podłoże odżywcze. Po hodowli w ciągu 48 godzin w temperaturze 30°C losowo odszczepia się wyrosnięte kolonie i przenosi do chudego sterylnego mleka, z którego po dalszych przesiewach w trzeciej generacji oznacza się poziom wytworzonej nizyny poprzez dany klon bakterii, stosując metodę rezazurynową. Spośród najaktywniejszych populacji pierwszego etapu konstruuje się mieszaną populację wyjściową do drugiego etapu, w którym izoluje się, jak w etapie pierwszym, klon bakterii o podwyższonej aktywności w stosunku do populacji wyjściowej. Ilość etapów stosowanych w sposobie według wynalazku zależy od aktywności populacji wyjściowej. Przy niskich wyjściowych zdolnościach biosyntezy nizyny przewiduje się 3 etapy procesu, natomiast przy populacjach o przeciętnej zdolności produkcyjnej, wynoszącej około 800 j/ml, uzyskuje się dobre wyniki już po pierwszym etapie.

Poniższy przykład wyjaśnia bliżej istotę wynalazku, nie ograniczając jego zakresu.

Przykład. Do 400 ml chudego jałowego mleka wprowadza się 3-procentowe inokulum, otrzymane uprzednio na drodze hodowli mikroorganizmów ze szczepu *Streptococcus lactis* na chudym mleku w temperaturze 30°C w ciągu 12 godzin. Hodowlę prowadzi się w temperaturze 30°C w ciągu 12 godzin przy mieszaniu elektromagnetycznym. Po tym czasie uzyskuje się początek stacjonarnej fazy wzrostu, hodowlę zobojętnia się sterylnym 20-procentowym roztworem wodorotlenku sodu do uzyskania wartości pH = 7,0, dodaje 1-procentowy roztwór cytrynianu sodu, całość dobrze miesza i osad komórek bakteryjnych odwirowuje w ciągu 15 minut przy około 4000 obrotów na minutę. Osad komórek dwukrotnie przemywa się buforem fosforanowym o wartości pH = 7,0 i następnie roztwarza w tym buforze do uzyskania zawartości suchej substancji, wynoszącej 0,45 mg/ml, a następnie pobiera 150 ml uzyskanej zawiesiny, zwanej zawiesiną podstawową, po czym dodaje 75 mg standartowej nizyny w proszku o mocy 10⁶ j/g, dokładnie miesza i pozostawia w temperaturze +4°C w ciągu 12 godzin. Po tym czasie do podstawowej zawiesiny wprowadza się N-metylo-N-nitrozo-N'-nitro-guanidynę w ilości, dającej stężenie 0,5 mg/ml, i miesza elektromagnetycznie, a następnie w czasie do 150 minut w określonych odstępach czasu przenosi po 1 ml do 9 ml buforu fosforanowego, schłodzonego do temperatury +4°C, przy wartości pH = 7,0, z którego mikroorganizmy wysiewa się na optymalną pożywkę agarową, stosując w miarę potrzeby rozcieńczenia w schłodzonym buforze fosforanowym o wartości pH = 7,0. Płytki inkubowano 48 godzin w temperaturze 30°C. Następnie z kolonii, które wyrosły, wyizolowano 103 klony bakterii i przeniesiono je do chudego sterylnego mleka, z którego po otrzymaniu skrzepu, przeszczepiono dwukrotnie wszystkie populacje na chude sterylne mleko. Sprawdzono zdolność nizynotwórczą wyizolowanych klonów bakterii, których aktywność nizynotwórcza wahała się w granicach 950–1500 j/ml podczas, gdy aktywność nizynotwórcza szczepu wyjściowego nie przekraczała 550 j/ml. Stabilność wyselekcjonowanych szczepów była dobra w ciągu trzech miesięcy. Szczep wyjściowy, zastosowany do izolacji klonów nizynotwórczych w pierwszym etapie, po upływie 3 miesięcy hodowli laboratoryjnej produkował jedynie około 150 jednostek nizyny w 1 ml hodowli na mleku.

W celu uzyskania populacji o aktywności nizynotwórczej, przekraczającej 2000 j/ml konstruuje się mieszane populacje wyjściowe, na przykład po selekcji z najlepszych populacji i dalej postępuje, jak powyżej opisano. Tabelka zawiera zestawienie wyników, uzyskanych w drugim i trzecim etapie selekcji.

Etap selekcji	Czas działania N-metylo-N-nitrozo- N-nitroguanidyny	Liczba wyizolowanych klonów	Liczba klonów o aktywności nizynotwórczej jednostek/ml			
			do 1000	do 1500	do 2000	powyżej 2000
Drugi	30 minut	39	30	9	brak	brak
	60 minut	39	25	11	2	1
	90 minut	39	29	5	4	1
Trzeci	30 minut	32	13	8	9	2
	60 minut	30	9	6	14	1
	90 minut	30	8	11	10	1
	120 minut	30	3	10	15	2

Wszystkie wyizolowane szczepy w pierwszym, drugim i trzecim etapie selekcji posiadały aktywność trwale podwyższoną, co wykazano w hodowlach laboratoryjnych, które prowadzono w ciągu 3–4 miesięcy. Szczep wyjściowy, zastosowany do izolacji nizynotwórczych w pierwszym etapie, po trzech miesiącach hodowli laboratoryjnej produkował jedynie około 150 jednostek nizyny w 1 ml hodowli na mleku.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania wysoko aktywnych nizynotwórczych populacji mikroorganizmów *Streptococcus lactis*, z n a m i e n n y t y m, że do zawiesiny nizynotwórczych bakterii *Streptococcus lactis* o zawartości biomasy 0,3–0,5 mg/ml, uzyskanej na początku stacjonarnej fazy wzrostu hodowli w mleku, wprowadza się nizynę w ilości 200–1000 j/ml, korzystnie 500 j/ml, dodaje N-metylo-N-nitrozo-N'-nitro-guanidynę w ilości, dającej stężenie 0,05–1,0 mg/ml, korzystnie 0,5 mg/ml, i przy mieszaniu całość przetrzymuje w czasie do 150 minut, korzystnie 60 minut, a następnie materiał biologiczny wyizolowuje się bezpośrednio lub po przechowaniu w temperaturze +4°C w czasie do 12 godzin.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że izolację materiału biologicznego prowadzi się jednoetapowo lub w kilku etapach, przy czym z najaktywniejszych populacji jednego etapu wybiera się populację wyjściową do następnego etapu.