

O problematice šlechtění kmenů produkujících penicilin

RNDr. VLASTA MATELOVÁ, CSc., Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

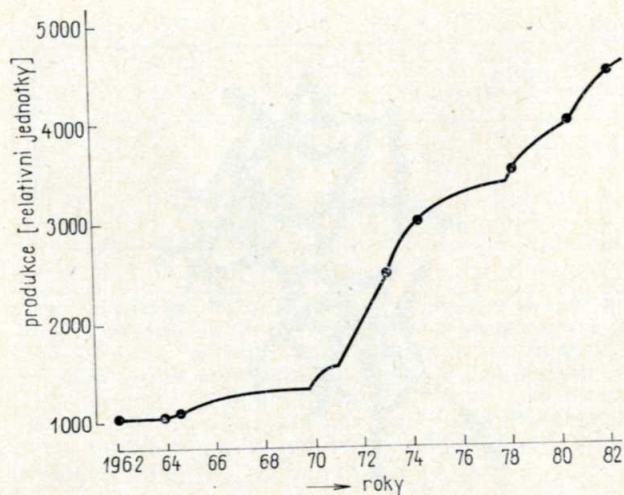
663.1 579

Klíčová slova: *Penicillium chrysogenum*, penicilin, šlechtění kmenů, produkční mikroorganismus, kultivace

Dnešní průmyslová technologie výroby penicilinu patří mezi nejlépe zvládnuté technologie fermentačního průmyslu. O tom svědčí enormní vzestup produkce z původních několika jednotek k současné několikadesetitisícové výtěžnosti. Na obr. 1 je znázorněn vzestup výtěžnosti u největšího evropského výrobce penicilinu, holandské firmy Brocades, v průběhu 20 let. Nabízí se otázka, co je hlavní příčinou této vzestupné tendence,

zda je to otázka kmene, fyziologie či tzv. engineering procesu [1]. Dá se říci, že na zvyšování výtěžnosti výroby se podílejí všechny uvedené faktory prakticky stejnou měrou, i když třeba v určitém období přispívá ke konečnému efektu některý směr významněji, jak vyplývá z uvedeného grafu.

Šlechtění penicilií má dnes již 40letou tradici. V počátečním údobí byly kmeny připravovány převážně na



Obr. 1. Výtěžnosti penicilinu u fy Brocades v průběhu 20 let. Vyznačené body znázorňují zavedení nového kmene do výroby

univerzitních pracovištích, teprve po 70. letech vznikly specializované společnosti, zabývající se šlechtěním. Tak vznikla v roce 1972 firma Panlab [2], která se rozhodla zahájit nový výzkumný program, jehož cílem bylo získávání vysokoprodukčních kmenů, jejich distribuce zákazníkům, včetně poskytování informací o fermentacích.

Firma Panlab v prvních 5 letech realizovala svůj program u firmy Toyo Jozo, po roce 1977 se přestěhovala na Tchaj-wan. U fy Toyo Jozo měla k dispozici pooprovozní zařízení o kapacitě 2000 a 3000 l a výrobní o objemu 45 000 litrů.

Na Tchaj-wanu byl výzkum redukován pouze na laboratorní měřítko, tento krok mohl být učiněn na základě zkušeností z předchozích 5 let, kdy v laboratoři získávané výseprodukční kmene byly obecně lepší i při fermentacích v tancích, pakliže byla provedena dostatečná optimalizační studie. Tato informace je velice zajímavá, zejména pro pracoviště s malou kapacitou poloprovozních zařízení, předpokládá však, že výrobní zařízení je na takové úrovni, aby získané výsledky byly zcela reprodukovatelné.

Obecně lze formulovat s'ed získávání kmenů takto:
indukce variace,
preselektce,
submerzní hodnocení,
fyziologické zkoumání,
ověřování v tanku.

Program zvyšování produkce kmenů se opírá o namátkovou selekci a testování mutagenizovaných kultur. Současně s rozšířením vědomostí o kontrole biosyntetických drah a prolomení kontrolních mechanismů s ve'kým úspěchem aplikovaným při nadprodukcí lvsinu, bývá do programu šlechtění zapojena i metoda přípravy biochemických mutantů nebo mutantů nepodléhajících zpětné inhibici samotným antibiotikem.

Okruh možných mutagenů pro mutagenizaci je široký, pro penicilia je dávana přednost dimethylsulfonátu, ethylmetansulfonátu a UV-světlu. Aplikace N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinu se nedoporučuje vzhledem k indukci mnohonásobných mutací v jednom genomu a tím k postupnému hromadění nežádoucích odchylných vlastností, které by se mohly progresivně kumulovat.

Pro přípravu biochemických mutantů se používají intermediáty a metabolity uplatňující se při biosyntéze penicilinu ve vysokých koncentracích v minimálním médiu. Na našem pracovišti jsme s úspěchem připravili kultury rezistentní na některé uvedené látky, které našly uplatnění při šlechtitelské práci. Proč rezistence vůči biochemickým intermediátům normálních metabolitů může být účinnou metodou pro selekci výseprodukčních mutantů, není zcela jasné.

Další cesta, která by měla vést ke zvyšování produkce, ale hlavně ke zlepšování dalších kritérií uplatňujících se při výběru kmenů, spočívá ve využití rekombi-

nační techniky aplikované na protoplasty a popsané v roce 1977 Anném [3].

Ne vždy jsou všechny uvedené stupně zařazeny do šlechtitelského programu, zejména málokdy je prováděna preselektce kultur, snad pouze v počátečním stadiu šlechtění aktinomycet produkujících antibiotika. Důvod, proč není prescreening prováděn, spočívá ve velice špatné korelaci mezi výsledky získanými v prescreeningu a při submerzním hodnocení kmenů. My jsme např. používali pro prescreening metodu agarových terčíků [4], po zhodnocení 20 000 izolátů jsme provedli statistické vyhodnocení na základě hodnot kvantiit a neprokázali jsme korelaci. Z tohoto důvodu jsme od této metody upustili.

Dalším možným předstupněm standardního submerzního hodnocení může být miniaturizované submerzní hodnocení, tj. takové, které je prováděno v malých nádobách s malým objemem fermentační pudy. Tato metoda je vhodná a představuje úsporu míst na třepacích strojích, její zavedení je podmíněno velkou kapacitou analyzátorů.

Důležitým momentem šlechtění je přístup k hodnocení izolátů. Podle jednoho pojetí je třeba detailně studovat kulturu pokládanou za výseprodukční a určit její nadřazenost nad rodičovskou statistickou analýzou po provedení řady nezávislých pokusů nebo je třeba uznat, že jde o nenormální distribuční křivku. Nejvyšší producenti však mohou být buď horními členy distribuční křivky nebo novými, výseprodukčními mutacemi. Jde-li o skutečnou mutaci, pak další mutagenní zásah je na místě. Nepředstavuje-li kmen nic víc než vysoké hodnoty distribuční křivky, pak použití takového kmene v následujícím cyklu je ekvivalentní aplikaci rodiče z předchozího cyklu. Při výběru kmenů je třeba mít na zřeteli, že kmen je třeba vybírat za normálních typických podmínek, jakákoliv fermentační anomálie vede k výběru kmenů, které za standardních podmínek nebudou lepší. Aby riziko nesprávného výběru bylo co nejmenší, je nezbytné postupovat současně v několika liniích kmenů a opouštět ty, které po sérii mutačních cyklů jsou nejméně produktivní. Pro rychlejší postup šlechtění je výhodnější druhý nestatistický přístup. Tímto způsobem lze postupovat bezprostředně od jednoho mutačního cyklu k druhému.

Nedílnou součástí kvality získaného kmene je jeho stabilita. Proto se doporučuje hodnotit izoláty ve druhé sporulační generaci, aby se mohla segregace genotypu projevit. K segregaci zřejmě dochází již v prvé sporulační generaci, důsledkem čehož je pak přerůstání rychle rostoucích a hůře sporulujících genotypů a snížení produkce v další generaci.

Neméně důležitou úlohu při hodnocení kmenů má fermentační prostředí. Podstatné je, aby kvalita surovin byla pokud možno konstantní a z toho důvodu se nedoporučuje používat např. kukuřičný extrakt jako součást fermentačního média. Ten byl vesměs nahrazen Pharmamedii, která se používá v kombinaci s anorganickým dusíkem. Mimo Pharmamedii, křidu a protipěnidla jsou všechny složky fermentačního média pro šlechtění penicilii čisté látky.

Vyrábí se buď V nebo G-penicilin. Prekurzor postranního řetězce pro biosyntézu G-penicilinu je toxický, pro V-penicilin nikoliv. Proto pro zjednodušení laboratorních prací je šlechtění vesměs prováděno na V-penicilin. Při biosyntéze penicilinu ve fermentačních tancích jsou prekurzory v průběhu fermentace dávkovány čili problém toxicity odpadá. Z dlouhodobých zkušeností zahraničních i našich vyplývá, že kultury se'ektované pro výrobu V-penicilinu jsou vhodné i pro biosyntézu G-penicilinu.

Při laboratorních fermentacích v baňkách je přenos kyslíku do fermentačního média podstatně nižší než v tancích, proto je třeba navodit takové podmínky, které by umožnily maximálně vysoký přenos kyslíku. Možností je několik: buď lze zvýšit otáčky nebo zvětšit výstředník, nebo používat zarážkované baňky nebo minimalizovat objem fermentační pudy. Zvýšení otáček je možné a velice účinné, ale při trvalém provozu třepacích strojů se zvyšuje jejich poruchovost. Při 240 ot. min⁻¹ lze bez technických problémů zvětšit výstřednost. Používání zarážkovaných baňek je problematické, neboť v nich pudy

pění a někdy vlnnou zátky. Nejvhodnější z uvedených způsobů zvýšení přenosu kyslíku je minimalizace objemu fermentačního média. Přenos kyslíku do baněk je také pochopitelně ovlivňován i uzavěrem baňky.

Se stoupající prošlechtěností kmenového materiálu může docházet k různým morfologickým změnám kultur, ke snížení sporulace, klíčivosti spor atd. Všechny tyto důležité charakteristiky je třeba průběžně sledovat a kmeny cíleně vybírat. Zhorší-li se u vybraného kmene sporulace, je výhodné provést rekombinaci kmenů pomocí fúze protoplastů vysokoprodukčního špatně sporujícího kmene s nížeprodukčním, ale dobře sporujícím.

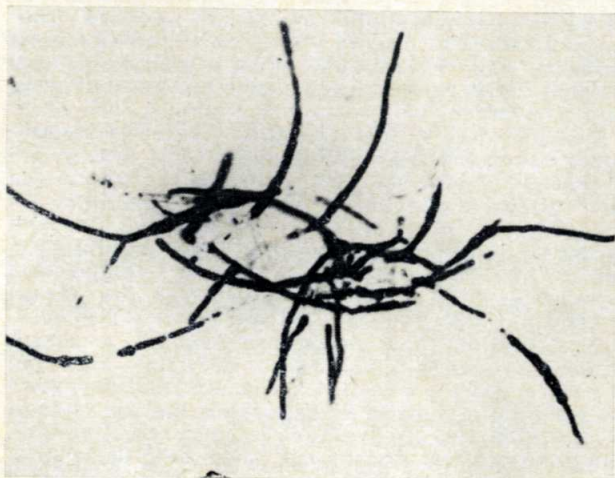
Cílený výběr výseprodukčních izolátů musí brát v úvahu i charakter mycelia, jeho odolnost na mechanické namáhání. Není žádoucí vybírat kmeny inklinující k vytváření dlouhých štíhlých vláken, které se při mechanickém namáhání lámou, ale je třeba vybírat kmeny se středně dlouhým, středně silným a především bohatě se větvcím myceliem. Tento typ kultur má i značné regenerační schopnosti, což je výhodná vlastnost při fermentacích v tancích. V neposlední řadě je třeba zdůraznit, že je to právě morfologie mycelia, která určuje viskozitu fermentačního média a tím celkovou reologii půdy.

Na obr. 2 a 3 je demonstrován typ nevhodného a požadovaného typu mycelia a na obr. 4 rychle a pomalu rostoucí mutanty vysokoprodukčních kmenů.

Rovněž permeabilita myceliární stěny má důležitost z hlediska komplexního posuzování kvalit mutanty. Je žádoucí, aby šlechtěním vznikaly kmeny s maximální propustností pro penicilin, aby se nezastavila biosyntéza z důvodu nadměrného hromadění produktu v buňce.

Stupeň využití prekurzoru, tj. kyseliny fenylacetové pro G-penicilin nebo fenoxycetové pro V-penicilin, resp. jejich solí, je důležitý z ekonomického hlediska. Cena prekurzoru je značná a ovlivňuje bilanci výroby. Proto je důležité provádět výběr kmenů nejen s ohledem na využití prekurzoru, ale i s ohledem na to, zda kultura neoxiduje prekurzor před jeho zabudováním do molekuly penicilinu, neboť potom je vlastně zabudována oxidovaná forma prekurzoru a vzniká nežádoucí hydroxypenicilin. Ze zkušenosti víme, že lze této reakci zabránit, je-li v médiu dostatek uhlíkového zdroje, který je přednostně oxidován, ale lze tento problém řešit i geneticky, přípravou mutant, které mají tuto reakci blokovanou.

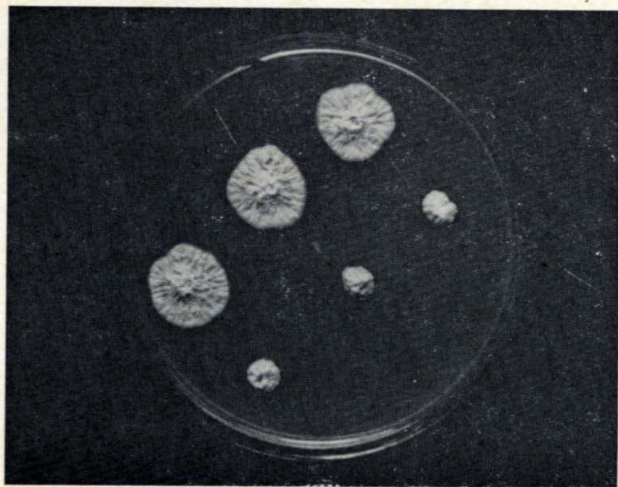
Nedílnou součástí fermentačního média, jak již bylo řečeno, je vedle organického zdroje dusíku i anorganický. Důvody k jeho užívání jsou vedle technických, technologických i ekonomické. Technické důvody spočívají ve snadném dávkování z roztoků, technologické spočívají např. v možnosti snadné regulace pH a ekonomické v ceně, a proto výběr kmenů s tímto aspektem je nezbytný. My jsme např. svého času připravili kmeny velice pro-



Obr. 2. *Penicillium chrysogenum* — nežádoucí typ mycelia z hlediska uplatnění při fermentacích v tancích



Obr. 3. *Penicillium chrysogenum* — vhodný typ mycelia z hlediska uplatnění při fermentacích v tancích



Obr. 4. *Penicillium chrysogenum* — rychle a pomalu rostoucí typy mutant

dukčně výhodné, které však produkovaly penicilin pouze v médiích s organickým zdrojem dusíku a již minimální koncentrace amonných iontů inhibovala biosyntézu penicilinu. Dnes pracujeme s kmeny, které jsou tolerantní k velmi vysokým koncentracím anorganického dusíku.

Selekci lze rovněž provádět na bázi akumulace 6-aminopenicilánové kyseliny. Ze své praxe víme, že čím má kmen vyšší produktivitu, tím při limitaci prekurzorem vytváří více 6-aminopenicilánové kyseliny.

Další kritéria, která ovlivňují ekonomiku výroby a tedy by se měla uplatnit při výběru kmenů, jsou

- produktivita kmene na jednotku objemu fermentační nádoby a času,
- konverze substrátů,
- efektivnost získání produktu z roztoku.

Jak bylo prokázáno, tvoří tzv. „prázdný objem“ ve fermentačním médiu daný obsahem mycelia přibližně 20 % objemu půdy. Tento myceliární objem je velice důležitý s ohledem na množství penicilinu, které lze získat při izolaci z fermentačního tanku, a proto je třeba posuzovat vybrané izoláty i z tohoto hlediska a nejenom podle účinnosti penicilinu v supernatantu.

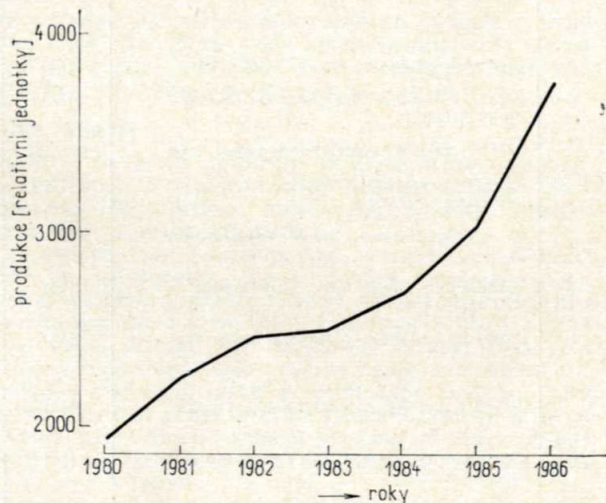
Rychlost konverze všech použitých surovin hraje důležitou úlohu při bilanci procesu, nejdůležitější však je konverze zdroje uhlíku, protože spotřeba tohoto zdroje je největší ze všech použitých surovin (15 i více procent). Přitom pouze 10 % tohoto zdroje je zabudováno do vlastního produktu, 25 % tvoří biomasu a 65 % je

Tabulka 1. Konverze zdroje uhlíku u různých kmenů

Kmen	Produkce penicilinu (mg · ml ⁻¹)	Konverze (g glukosy na g penicilinu)
P-2	9,0	0,05
P-7	17,4	0,10
P-11	21,8	0,12
P-13	27,0	0,09
P-15	29,4	0,12

spotřebováváno na celkový metabolismus. O tom, že konverze uhlíkatého zdroje je u různých kmenů různá, vypovídá *tab. 1*, kterou uvádějí pracovníci fy Panlab [5].

Závěrem lze uvést výsledky, kterých jsme dosáhli v našem ústavu v průběhu posledních let při studiu zvyšování výtěžnosti penicilinu (*obr. 5*). Výsledného efektu se dosáhlo změnou genotypu kmenů a optimalizací fermentačních postupů.



Obr. 5. Vyrůst výtěžnosti penicilinu v průběhu posledních let dosažený ve VÚAB

Literatura

- [1] VANDAMME, E. J.: Biotechnology of Industrial Microbiology, Ed. M. Dekker, Inc., USA, 1984.
- [2] LEIN, J.: Overproduction of Microbial Metabolites. Strain Improvement and Process Control Strategies. Ed. Z. Vaněk a Z. Hošťálek, USA, 1986.
- [3] ANNÉ, J.: Agricultura. **25**, 1977, s. 1.
- [4] ZELENÝ, K.: Rychlé screeningové metody pro selekci vysoko-produkčních kmenů *Penicillium chrysogenum*. (Kandidátská disertační práce), Praha, 1981.
- [5] ELANDER, R. P. - AOKI, H.: Chemistry and Biology of betalactam Antibiotics. Vol. 3. The Biology beta- lactam antibiotics. Ed. R. B. Morin a M. Gorman, 1982.

Matelová V.: O problematice šlechtění kmenů produkujících penicilin. Kvas. prům. **33**, 1987, č. 11, s. 326—329.

Šlechtění kmenů a optimalizace podmínek fermentace umožňují plynulý vzestup výtěžnosti penicilinu. V článku je konfrontován stav ve světě i v ČSSR a je diskutována problematika šlechtění.

Мателова, В.: О проблематике селекции штаммов — продуцентов пенициллина. Квас. прум. **33**, 1987, № 11. стр. 326—329.

Селекция штаммов и оптимизация условий ферментации позволяют возможным непрерывное повышение выходов пенициллина. В статье сравнивают уровень в мире и в ЧССР и дискутируют проблематику селекции.

Matelová, V.: Problems Concerning Selection of Strains Producing Penicillin. Kvas. prům. **33**, 1987, No. 11, pp. 326—329.

Selection of strains and optimization of cultural conditions make possible a continuous increase of penicillin yields. A comparison of conditions abroad and in our country as well as the problems of selection of producing strains are discussed.

Matelová, V.: Über die Züchtungsproblematik der Penicillinproduzierenden Stämme. Kvas. prům. **33**, 1987, Nr. 11, S. 326—329.

Die Züchtung der Stämme und die Optimalisation der Fermentationsbedingungen ermöglichen den laufenden Aufstieg des Penicillinsertrages. In dem Artikel wird der Stand in der Welt und in der ČSSR konfrontiert und die Züchtungsproblematik diskutiert.