

Stabilita antibiotické produkce u streptomycet

Ing. PAVEL VYSKOČIL, RNDr. KAREL ZELENÝ, CSc., Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Průmyslová výroba založená na biologických pochodech mikroorganismů vyžaduje technologie schopné zaručit reprodukovatelné výsledky. Nestabilita kultur byla vážným problémem už v počátcích výroby antibiotik. Například v roce 1954 popisují *Perlman et al.* [1954] pokles produkce streptomycinu spojený s přenosy inokula do nové půdy pro pomnožení vegetativní formy kultury. Pouhé tři přenosy snížily u *Streptomyces griseus* produkci o 50 %.

Byla vyslovena řada hypotéz o možných příčinách degenerace u streptomycet. Protože se ztrácí antibiotická produkce vyskytuje ve velmi vysokých frekvencích, nemůže být vysvětlena na základě náhodných mutací.

Heterokaryose u streptomycet dost běžná [*Hopwood a Merick*, 1977] může při segregaci, k níž dochází hlavně při tvorbě spor, vyústit ve snížení produkčního potenciálu. Domněnku podporují výsledky elektronmikroskopického pozorování protoplastů streptomycet dokazující přítomnost dvou a více chromosomálních oblastí v protoplastech [*Pigac et al.*, 1982, *Gumpert*, 1982], při zjištění minimálně dvojnásobného obsahu DNA v protoplastech v porovnání se sporami. Uvážíme-li vysoké frekvence rekombinací po navození fúzí protoplastů, nelze vyloučit, že na nestabilitě se podílí rekombinace mezi chromosomy v buňkách.

Korelace antibiotické syntézy s přítomností určitého druhu plasmidové DNA vede často k tvrzení, že plasmidy jsou zapojeny do produkce antibiotik [*Hopwood*, 1978]. Je zřejmé, že prostředky způsobující eliminaci plasmidů nebo přeskupení sekvencí jejich DNA vedou též k eliminaci antibiotické produkce [*Vyskočil a Zelený*, 1982]. Pokud je nedokonale zajištěna stejná distribuce plasmidů do nově vytvořených buněk, stávají se znaky determinované plasmidy nestabilními.

Opakující se sekvence DNA, které tvoří až 12 % celkového obsahu DNA, jsou ve streptomycetách značně rozšířené a mohou sehrát důležitou roli v chromosomální a plasmidové nestabilitě [*Chater*, 1982]. Byla pozorována korelace mezi nestabilitou streptomycet a pře-

skením tandemově uspořádaných opakujících se sekvencí [*Ono et al.*, 1982]. Skutečnost, že snadno navoditelné změny v plasmidové i chromosomální DNA, zvláště s ohledem na opakující se sekvence, nevedly ke vzniku auxotrofních mutací, opravňuje k názoru, že tyto změny postihují geny zúčastněné v sekundárním metabolismu [*Schrempf*, 1982].

Existuje ještě řada dalších mechanismů, které mohou vést k nestabilitě antibiotické produkce [*Chater*, 1980]. V úvahu je nutno vzít zejména transpozony a inserční sekvence, které zvětšují přirozenou genetickou variabilitu mikroorganismů.

Roth a Noack [1982], popsali vliv fyziologických podmínek na výskyt degenerovaných variant *Streptomyces hygroscopicus*. Při sledování limitace různými zdroji živin v médiu za podmínek chemostatu byla pozorována nejvyšší frekvence těchto variant při limitaci zdrojem uhlíku a nejnižší při limitaci zdrojem dusíku.

Streptomycety se mnohem více podobají vláknitým houbám ve svých reakcích na metody uchovávání, v životaschopnosti, prevenci nestability a chování ve fermentačním médiu než nevláknitým baktériím [*Dietz*, 1982]. S ohledem na uchovávání každý druh vyžaduje specifické podmínky, aby si zachoval jak životaschopnost, tak produkci žádaného metabolitu.

Byl publikován velký počet metod o uchovávání streptomycet. Převládá většina však nepracuje s kmeny, které mají průmyslový význam, nebo podstatné detaily nezveřejňuje, protože jsou obvykle zařazeny mezi výrobní tajemství [*Dietz*, 1981]. K uchování vlastností kultury obvykle nestačí vědět, zda tato má být lyofilizována, skladována ve sterilní půdě nebo v kapalném dusíku, ale též je nutné znát např. na jakém médiu a za jakých podmínek má být kultura před uchováním pěstována, zvláštnosti konzervace, postup při obnově životaschopnosti a produkčnosti kultury a další.

Zde je důležité si uvědomit, že vzhledem k nedostatku teoretických podkladů o příčinách degenerace streptomycet zahrnují metodiky uchovávání jednotlivých kul-

tur též soubory empirických poznatků s různou mírou obecnosti a platnosti. Tyto metodiky vedou k pozitivním výsledkům pouze tehdy, jsou-li dodrženy v potřebné míře jednotlivé kroky celého postupu, neboť často je obtížné rozlišit, který detail z používané techniky je pro uchování rozhodující.

Udržení produkčního potenciálu kmenů streptomycet je součástí problémů řešených ve Výzkumném ústavu antibiotik a biotransformací. Nároky stoupají se zvyšující se prošlechtěností kmenového materiálu.

S ohledem na stabilitu produkce antibiotika je nezbytná optimalizace půd ztužených agarem, které jsou nutné k manipulaci s jednotlivými izoláty. Důležité je nejen složení média, ale i jeho fyzikální vlastnosti, které ovlivňují rychlost výměny metabolitů, přičemž optimální složení a vlastnosti u půd pro nárůst izolovaných kolonií a pro vytvoření spojitých pokryvů se obvykle neshodují.

Ani moderní způsoby uchovávání nesnižují význam selekce jako metody pro udržení produkčního potenciálu a dalších vlastností kmene.

Uchovávání kmenů v kapalném dusíku řeší problém nestability zakonzervovaného biologického materiálu s časem. Například u *Streptomyces aureofaciens* nebyl zjištěn pokles produkce chlortetracyklinu v průběhu skladování ve srovnání s hodnotou stanovenou ihned po zakonzervování. U lyofilizovaných kmenů byl tento pokles velmi častý. Pro zmrazení se osvědčila média běžně užívaná při lyofilizaci streptomycet s přídavkem 10 % glycerolu. Izoláty jsou uloženy v polyethylenových polštářcích, které oproti skleněným ampulím jsou při manipulaci mnohem pohodlnější a bezpečnější. Kontejnery na kapalný dusík s velkým objemem jsou vzhledem k množství uloženého materiálu provozně úspornější a navíc velké objemy skladovaného kapalného dusíku snižují riziko zničení kultur při dočasném výpadku zásobování. Skladování v kapalném dusíku odhaluje zcela nové perspektivy při standardizaci výrobního procesu.

Literatura

- [1] DIETZ, A.: in Biotechnology, Vol. 1 [H. J. Rehm, G. Reed, eds.], Verlag Chemie, Weinheim 1981, s. 411.
- [2] DIETZ, A.: in Bioactive microbial products: search and discovery [J. D. Bu'Lock, L. J. Nisbet, D. J. Winstanley, eds.], Academic Press 1982, s. 27.
- [3] GUMPERT, J.: Z. Allg. Mikrobiol. **22**, 1982, s. 617.
- [4] HOPWOOD, D. A., MERRICK, M. J.: Bacteriol. Rev. **41**, 1977, s. 595.
- [5] HOPWOOD, D. A.: Ann. Rev. Microbiol. **32**, 1978, s. 373.
- [6] CHATER, K. F.: in The stability of industrial organisms (B. E. Kirsop, ed.), Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, 1980, s. 7.
- [7] CHATER, K. F.: Nature **299**, 1982, s. 10.
- [8] ONO, H., HINTERMANN, G., CRAMERI, R., WALLIS, G., HÜTTER, R.: Mol. Gen. Genet. **186**, 1982, s. 108.
- [9] PERLMAN, D., GREENFIELD, R. B., O'BRIEN, E.: Appl. Microbiol. **2**, 1954, s. 199.
- [10] PIGAC, J., HRANUELI, D., SMOKVINA, T., ALAČEVIČ, M.: Appl. Environ. Microbiol. **44**, 1982, s. 1178.
- [11] ROTH, M., NOACK, D.: J. Gen. Microbiol. **128**, 1982, s. 107.
- [12] SCHREMPF, H.: J. Bacteriol. **151**, 1982, s. 701.
- [13] VYSKOČIL, P., ZELENÝ, K.: Biotechnol. Lett. **4**, 1982, s. 277.

Vyskočil, P., Zelený, K.: Stabilita antibiotické produkce u streptomycet. Kvas. prům. **30**, 1984, č. 9, s. 211–212.

Jsou uvedeny možné příčiny nestability antibiotické produkce u streptomycet. Při rozboru obecně platných zásad pro uchovávání kmenů jsou popsány pozitivní zkušenosti se skladováním v kapalném dusíku.

Высочил, П., Зелены, К.: Стабильность продукции антибиотиков у стрептомицетов. Квас. прум. **30**, 1984, № 9, стр. 211–212.

Возможные причины нестабильности продукции антибиотиков были приведены. Хорошие опыты с жидким азотом были описаны вместе с общими принципами сохранения штаммов.

Vyskočil, P., Zelený, K.: Antibiotic Production Stability of Streptomycetes. Kvas. prům. **30**, 1984, No. 9, pp. 211–212.

Possible causes of antibiotic production instability of streptomycetes are discussed. Positive experiences with storage of strains in liquid nitrogen among general principles of storage are given.

Vyskočil, P., Zelený, K.: Stabilität von antibiotischen Produktion bei Streptomycetes. Kvas. prům. **30**, 1984, No. 9, S. 211–212.

Möglichen Ursachen von Unstabilität der antibiotischen Produktion bei den Streptomyceten eingegeben sind. Bei der Analyse von häufig gültigen Prinzipien für erfolgreiche Stammkonservierung positive Erfahrungen mit der Kulturlagerung im flüssigen Stickstoff gewonnen wurden.