

Prof. dr Marija Alačević
Tehnološki fakultet — Zagreb

Stvaranje novih oblika mikroorganizma

Vrlo se mali broj industrijskih mikrobnih procesa izvodi s više sojeva iste vrste ili s više pojedinačnih divljih tipova različitih vrsta mikroorganizama. To je ograničeno samo na neke prehrambene proizvode i na industriju pića. Proizvodni mikroorganizmi u većini slučajeva su genetički potpuno različiti od divljih tipova iz kojih su proizašli, upravo kao što su biljke i životinje u poljoprivrednoj proizvodnji različite od svojih prirodnih predaka. Prisilna evolucija poljoprivrednih organizama tekla je nešto sporije nego što taj proces teče kod mikroorganizama, koji imaju specifične odlike, a to su kratko generacijsko doba i brojna populacija za kratko vrijeme. Potpuno identičan osnovni pristup dobivanja novih tipova organizama može se pratiti pri oplemenjivanju svih korisnih organizama, uključujući mikroorganizme, a to su: mutacije, rekombinacije (hibridizacija) i selekcija. Ove tri metode, koje se na različitim nivoima provode različitim tehnikama, osnova su čak i za najrafiniranije moderne metode molekularne genetike, tzv. genetičko inženjerstvo. Bez obzira na primijenjenu tehniku pri oplemenjivanju mikroorganizama osnovni problem uvijek predstavlja efikasna selekcija. Dok je kod viših organizama sa relativno malobrojnim, prostim okom vidljivim, potomstvo, selekcija teoretski jednostavnija, kod mikroorganizama je vrlo teško izdvojiti poželjnu jedinku iz buljonske populacije te ponekad iziskuje više intelektualne i praktične umješnosti nego što mu sama metoda pruža za dobivanje poželjnog svojstva. U tab. 1. prikazan je postupak kojim bi trebalo, a djelomično se već i provodi, oplemenjivati industrijske mikroorganizme.

Do sada se u zatvorenim industrijskim laboratorijama oplemenjivanje provodilo najviše indukcijom mutacija te selekcijom jediniki željenih svojstava, a ponekad i rekombinacijama, ali uglavnom empirijski. Vrlo uspješni dosadašnji proizvodni sojevi dobiveni su

većinom slučajno, izolacijom soja s poboljšanim svojstvom zahvaljujući dugotrajnom i mukotrpnom tapkanju i primjeni vrlo skupih tehnika koje su se ipak isplatile zbog ogromnog povećanja prinosa. Primjer je proizvodnja penicilina.

U današnjem stadiju razvoja mikrobne genetike ovaj se pristup ni u kom slučaju ne može opravdati. Ako moramo izvršiti samo deset uzastopnih mutacija da bismo dobili povoljna proizvodna svojstva nekog soja, ovaj će neminovno biti defektan, pa, prema tome, nestabilan u industrijskom postupku. Za izvođenje tolikog broja mutacija uz vrlo pedantnu selekciju, potreban je velik broj ljudi i materijala, pa je taj postupak neobično skup. Križanjem samo dva soja sa svega pet mutacija dobit ćemo teoretski 1024 rekombinacije ispitivanih gena, a to nam uz pedesnu selekciju omogućava izbor niza sojeva koje novim mutacijama nikada ne možemo postići. Pri izvođenju mutacija uvijek pristupamo slučajnoj mutagenezi, jer ne možemo unaprijed usmjeriti na određeni položaj DNA na koji bi mutagen djelovao, osim u slučaju postupka komutacije s MNNG-om, pa isključivo selekcija iz ogromnog broja preživjelih omogućava dobivanje soja željenih svojstava. Pri križanju možemo, osim dobivanja rekombinanata u većem broju kombinacija prirodnih i mutiranih svojstava, analizom potomstva izračunati položaj ispitivanih markera na kromosomu, što nam omogućava u budućim križanjima dirigiranu rekombinaciju. Analiza rekombinanata, ukoliko vršimo križanje s više markera, iziskuje dugotrajna izračunavanja nakon selekcije koja ne obuhvaća one rekombinante koji sadrže sve gene jednog roditelja. Zato je nužna upotreba određenih pomagala ili konstrukcija posebnih fertilnih sojeva među kojima nije nužna oštra selekcija. Tek 1963. godine (Sermonti i Casciano) zapažena je određena polarnost u nekim križanjima mutanata vrste *Streptomyces coelicolor*, za razliku od *E. coli* u koje su tipovi fertilnosti definirani već 1950. god. (Cavali-Sforza). Daljnja ispitivanja fenomena fertilnosti u streptomiceta (Sermonti, 1969; Vivian i Hopwood, 1973) pokazali su da postoji nekoliko različitih tipova fertilnosti, koji su kasnije uvjetno označeni simbolima UF, NF i ND, a svi su izolirani iz osnovnog IF tipa nakon djelovanja UV svjetlosti.

Praćenje križanja streptomiceta, otežano je njihovim micelij-skim načinom rasta, zbog kojeg se proces prijenosa genetičkog materijala znatno razlikuje od prijenosa u prvih bakterija. Zbog prokariotske stanične organizacije, streptomiceti se razlikuju i od plijesni, u kojima se seksualni proces odvija putem prave zigote.

Za efikasno izvođenje križanja potrebno je dobiti što fertilnije sojeve, poznavati način prijenosa genetičkog materijala i definirati strukturu svakog pojedinog tipa fertilnosti, kako bi se za željena križanja mogli odabrati sojevi najpogodnijeg tipa.

* Rezultati ovih ispitivanja mogu dati podatke, kako o samom načinu prijenosa kromosoma i formiranja merozigote, tako i o mogućnostima konstrukcije donorskih sojeva pogodnih za efikasno prenošenje željenih markera u križanju.

Kompjutersko izračunavanje. — Obrada postojećih podataka, kao i podataka iz novih križanja pomoću kompjutera omogućila je popunjavanje i dokazivanje mape bakterije *Streptomyces rimosus*. Podaci segregacije križanja i heteroklona sa osam i više markera mogu se ovom tehnikom analizirati u jednoj minuti. Autput kompjutera uključuje izbor permutacije gena tražeći minimalni broj Cross-overa, raspoređivanje frekvencije alela u gradijente, preračunavanje frekvencije rekombinanata među parovima alela uz eventualno uključivanje i χ^2 testova i testiranje aditivnosti između bliskih distanci.

Velike mogućnosti dobivanja novih tipova daju nam metode križanja pomoću protoplasta. Uz pomoć polietilenglikola, kao sredstva koje izaziva spajanje protoplasta, nastaju zigote ne samo unutar jedne vrste već među različitim vrstama. Grupa istraživača u Lenjingradu, koji se intenzivno bave genetikom kvasaca, radi na konstrukciji novih tipova organizama u kojima bi stanica kvasca bila domaćin za integralni protoplast azotobacteria koji u sebi nosi plazmid odgovoran za fiksaciju atmosferskog dušika. U prirodi je poznata zajednička mogućnost fiksacije dušika samo suradnjom bakterije rhisobium i leguminoza. Ova istraživanja iziskuju još mnogo intenzivnog rada do uspješne realizacije.

Inter i intraspecijska križanja protoplasta omogućit će kombiniranje sojeva s različitim biosintetskim putevima poznatih proizvoda što će nužno dovesti do novih kombinacija i, prema tome, novih produkata. Dugogodišnja mukotrpnja prekopavanja zemljine površine ili morskog dna radi otkrivanja novih antibiotika koji bi preskočili ograničenje već sada postojeće multirezistencije nekih patogenih mikroorganizama, mnogo manje obećavaju.

Sve veći broj novih mutagena omogućava nam dobivanje različitih tipova mutanata. Nužno je stoga ispitivati mehanizam djelovanja upotrijebljenih mutagena. Posebno su značajna istraživanja reparacijskih mehanizama, specijalno onih sklonih grešci, kao što je, na primjer, SOS sistem (Radman, 1974). Uvjeti uzgoja nakon mutageneze djeluju uvelike na pojavu i fiksiranje nastale mutacije pa su takva istraživanja neophodna za svaki proizvodni organizam posebno.

Fundamentalna perspektiva za detaljno poznavanje načina replikacije DNA i nastanka greške aktivnošću uključenih enzima, omogućava nam da neposrednim djelovanjem na enzimske reakcije u stanici povećamo i usmjerimo mutagenezu u određenom smjeru.

Pojava komutacije sa MNNG-om ukazuje koliko je s nekim mutagenima moguće izvoditi usmjerenu mutagenezu na određenom lokusu i u njegovoj neposrednoj blizini. Za ova istraživanja nužno je poznavati položaj određenih gena na kromosomskoj mapi kao i nalaženje pogodnih selektivnih metoda za određeni metabolit. Komutacija u prokariotskih organizama dobro je proučena (*Escherichia coli*, *Streptomyces coelicolor*) čak i u vrste koja proizvodi komercijalni antibiotik, kao što je OTC (*S. rimosus*). Prokariotski organizmi imaju u nakupinama usko povezane gene koji koordiniraju biosintezu izvjesne supstance, npr. aminokiseline, vitamina, purinskih i pirimidinskih baza, kao i antibiotika OTC (Pigac, 1975), actinorodin (Hopwood, 1975). Ovakav raspored omogućava izolaciju specijalnih sojeva oštećenih u regulatornim genima. Posljedica je oštećenja permanentna sinteza željenog proizvoda, koji normalna stanica putem povratne veze finalnim produktom onemogućava. Jaki mutageni kao što su ionizirajuća zračenja, izazivaju veliku smrtnost zbog nastalih kromosomskih aberacija, međutim ponekad mogu, naročito u eukariotskim mikroorganizmima, izazvati duplikaciju pojedinih dijelova ili čitavih kromosoma. Duplikacija može dovesti do povećanog prinosa željenog produkta ukoliko su duplicirani oni geni koji su uključeni u njegovu biosintezu. Amplifikacija ili povećanje broja gena uključenih u biosintezu znatno utječe da se poveća produkcija. Duplikacija gena se, osim tretmanom jakim mutagenim sredstvima, može izazvati i drugim postupcima, na primjer: različitim tipovima rekombinacija (konjugacijom, odnosno nastankom merozigote u prokariota ili paraseksualnim ciklusom u eukariota); stabilizacijom heterokariona ili diploida nastalih paraseksualnim ciklusom u plijesni koje nemaju redoviti seksualni ciklus, na sličan način kao i stabilizacijom disomičnih regija u prokariota.

Djelimične diploide moguće je stabilizirati tako da se stvore uvjeti pri kojima mogu preživjeti samo one jedinke koje imaju disomičnu regiju u kojoj se nalaze geni odgovorni za biosintezu željenog metabolita. Stabilizacija se postiže uvođenjem auktotrofnih markera u oba kraka disomične regije, tako da gubitak jednog disomičnog fragmenta onemogućava sintezu metabolita koji nedostaje u podlozi pa, prema tome, takve jedinke nemaju uvjeta da prežive. U odnosu na metabolit koji želimo dobiti u povećanim količinama moguće je dobiti povećani broj odgovarajućih gena različitim uvjetima uzgoja ili pak metodama koje omogućavaju umnažanje samo onih gena koji su odgovorni za sintezu željenog produkta. Povećanje proizvodnje primarnog metabolita za koji se odgovorni geni nalaze u blizini inicijalne točke replikacije, postiže se npr. forsiranom ishranom i pogodnim uvjetima pri kojima se stanica dijeli za 20 minuta, iako replikacija DNA traži 60 minuta (*Escherichia coli*) (Donachi, 1973). DNA se u tom slučaju višestruko replicira, odnosno nova inicijacija replikacije počinje čim proteinske mase stanice, odnosno enzima, ima dovoljno iako još nije završena prva replikacija. Tako

mogu u istoj stanici biti i okteti istovjetnih gena najbližih inicijacijskoj točki replikacija.

Posebno mogućnost uvećanja broja gena i prenosa određenih gena iz stanice u stanicu, pružaju epizomi i fagi. Epizomi, odnosno plazmidi (genomi bakteriofaga kao separatan slučaj) imaju posebni značaj u oplemenjivanju proizvodnih sojeva, jer mogu egzistirati i replicirati se autonomno od kromosoma. Pomoću njih je moguće umnožavanje i unošenje u genom stranih gena koji se inače, procesom rekombinacije, odnosno Crossing-overom, ne mogu uključiti u kromosom. Oni dozvoljavaju selektivnu amplifikaciju nekih gena istog organizma ili drugog organizma a, prema tome, i njihovih produkata. Plazmidi u užem smislu nisu još pronađeni u eukariota (osim virusa). Ruski autori najavljuju postojanje plazmida u stanicama kvasaca, ali podaci nisu još potvrđeni. Možemo vrlo brzo očekivati opisivanje plazmida i u višim eukariotima. Životinjski virusi vjerovatno će biti upotrijebljeni kao vektori strane DNA u kulturi animalnih stanica; virusi mozaika cvjetače mogu se upotrijebiti za biljne stanice; mini-kružići DNA mogu biti djelotvori u kvasaca, a kada se pronađu metode sljepljivanja RNA molekula genoma fungalnih virusa, oni će se moći korisno upotrijebiti u genetičkom inženjerstvu (L e m k e et al., 1976). Za sada su poznata tri tipa eksperimenata s plazmidima koji imaju industrijski značaj:

1. *upotreba prirodnih položaja nekih gena na plazmidu*, kao, npr., gena odgovornih za degradaciju ugljikovodika u pseudomonasa i biosintezu antibiotika u streptomiceta (onih u kojih je »in vivo« pojava iskorištena kao mogućnost za »in vitro« manipulaciju plazmidima, odnosno prenošenje korisnih gena na plazmide);

2. *korisni prirodni plazmidi* — neki sojevi *Pseudomonas putida* i *P. oleovorans* nose plazmide koji kontroliraju degradaciju različitih ugljikovodika (C h a k r a b a r t y, 1976) mnogi su od ovih plazmida (za kamfor, salicilat, toluat ili naftalen) sex-faktori sposobni da prijeđu iz stanice u stanicu pomoću konjugacije, dok drugi (za oktan i kselen) iziskuju posebne vektore za prenos. Mnogi plazmidi pripadaju različitim grupama kompatibilnosti i tako se mogu prenijeti putem rekombinacije, a tada rekombinanti posjeduju svojstva razgradnje obaju sojeva (F r i e l l o et al., 1976). To je izvrstan primjer manipulacije prirodno postojećih plazmida i konstrukcije novih sojeva. Dok je identifikacija plazmida pseudomonasa ovisila na početku o studijama rekombinacija, transfer izvjesnog fenotipa u stanicu recipijenta u mnogo većoj frekvenciji moguć je uz pomoć izolacije odgovarajućeg gena (C h a k r a b a r t y, 1976). U streptomiceta su plazmidi koji su odgovorni za sintezu antibiotika, do sada dokazani samo genetičkim metodama. Postoji mogućnost da se unošenjem plazmida različitih vrsta streptomiceta omogućí biosinteza hibridnih antibiotika, odnosno novih molekula. Mogućnost skretanja biosintetskih puteva pomoću blokiranih mutanata bila je već ranije dokazana (V a n e k, et al., 1971).

Druga mogućnost upotrebe prirodnih plazmida jeste prijenos gena odgovornih za biosintezu antibiotika na soj s mnogo boljim svojstvima uzgoja od ishodnog soja, npr. ako mu je rast pogodniji za izolaciju ili ako koristi jeftiniju podlogu (prenos plazmida SCP₁ iz *Streptomyces coelicolor* u *S. lividans* i *S. parvulus* koje su pogodnije za rad na povećavanju prinosa);

3. *Konstrukcija novih plazmida.* — Primjena prirodnih plazmida koji nosi neke korisne gene, primjer je kako se mogu prenijeti putem plazmida i neki geni koji su na plazmid uneseni iz nekog drugog izvora — s kromosoma nekog drugog soja ili s drugog plazmida. Ovaj postupak moguće je izvesti »in vivo« ili »in vitro« tehnikom. »In vivo« rekombinacija nehomolognih gena poznata je već mnogo godina. To je, npr., prenošenje pojedinih gena posredstvom faktora fertiliteta (F' sojevi *E. coli*), zatim konstrukcija specijalnih transduktivnih čestica faga i Ø 80 *E. coli*, te spajanja segmenata R faktora za dobivanje novih kombinacija rezistencije na antibiotik. Istraživanje sekvencija insercije i genetičkih elemenata koji mijenjaju poziciju »transposable elements«, kao u slučaju s bakteriofagom *Mu* (Cohen, 1976), procesi kojima podliježu barem neke od neredovitih rekombinacija postaju sada mnogo jasniji. Pri korištenju ovih fenomena za konstruiranje novih sojeva, neophodna je efikasna selekcija, odnosno poznavanje pogodnih metoda za izolaciju željenog fenotipa, a poznavanje naročitih osobina »transposable« elemenata i faga *Mu*, uvelike pomaže pri razumnom izboru odgovarajućih križanja.

Tab. 1. Mogućnosti dobivanja većeg prinosa i novih proizvoda genetičkim metodama

Način oplemenjivanja	Prinos		Druge važne tehnološke osobine
	iste supstance	nove supstance	
Prirodna selekcija	+	—	Sporulacija brzina rasta
Mutacije i selekcija, nakon tretmana, više stepena mutageneze	++	± —	Pjenjenje, jeftinije supstance, tolerancija prema temperaturi, rezistencija na fage
Interspecijske rekombinacije i manipulacije genima	+++	+	Povoljne kombinirane tehnološke karakteristike filtracije, ekstrakcije itd.
Interspecijske i rekombinacije udaljenih klasifikacionih jedinica i manipulacija genima	+++	+++	Velike mogućnosti kombiniranja; eukariotski proizvodi u prokariotu

Na žalost, naše poznavanje genetičkog manipuliranja ograničeno je samo na bakterije *E. coli* i *S. typhimurium*. Uz određene napore moći će se »in vivo« tehnike razviti i za oplemenjivanje industrijskih prokariota. Potrebno je također razviti odgovarajući sistem za »in vitro« plazmidnu rekombinaciju (genetičko inženjerstvo), odnosno prenos i amplikaciju gena istih ili bliskih vrsta. Ne smijemo potpuno odbaciti niti prednost prenosa gena između potpuno udaljenih organizama. Najveći intenzitet rada na genetičkom inženjerstvu usmjeren je u ovom momentu na poboljšanje metoda za kloniranje strane DNA u *E. coli*, dobivanje još uspješnijih plazmid- i fag- vektora uključujući dobivanje uspješnih promotora za transkripciju uključenih gena; zatim pronalaženje prihvatljivije metode insercije nehomolognih DNA segmenata u njih; kao i metoda za prepoznavanje klonova koji nose željenu DNA-sekvencu. U eksperimentima u kojima je planirana DNA-sekvencu sama po sebi ono što tražimo, možda nema ni smisla ići izvan *E. coli*, ali za industrijsku primjenu u kojoj su potrebni proizvodi gena, polje rada je mnogo šire. Jedan tip rekombinacija koristit će bakteriju domaćina za transkripciju i translaciju informacije s novo uključenog segmenta; dobro poznati slučaj insulina je primjer. Ulogu domaćina može preuzeti bilo koja proizvodna bezopasna (nepatogena) bakterijska vrsta (ne mora, ali može biti i *E. coli*). Sistem bi trebalo usavršavati sve dotle dok novi domaćin ne bude proizvodio željeni proizvod u sve većim količinama, na što bi trebalo da genotip samog domaćina ima značajan uticaj. Prema tome, izbor domaćina može biti osobito važan, a onda će se ukazati beskonačne mogućnosti za poboljšanje soja pomoću sada bliskog trojstva: mutacija, rekombinacija, selekcija, nakon što je originalno uključivanje stranog gena postignuto.

LITERATURA

- Alačević, M. (1976). Recent advances in *Streptomyces rimosus* genetica. Cavali - Sforza, L. L. (1950). La sessualità nei batteri. Boll. Ist. Sieroter., Milan, 29, 281.
- Chakrabarty, A. M. (1976). Molecular cloning in pseudomonas. Microbiology 1976.
- Cohen, S. N. (1976). Transposable genetic elements and plasmid evolution Nature (Lond.) 263:731-738.
- Donachie, W. D., Jones, N. C. and Tether, R. (1973). The bacterial cell cycle. Microbial Differentiation, Twenty-third symposium of the soc. for gen. microb., London. University Press, Cambridge.
- Friello, D. A. J., R. Monroe and A. M. Chakrabarty, 1976. Use of genetically-engineered multi-plasmid microorganisms for rapid degradation of fuel hydrocarbons, Vol. 3 in Biodegradation of materials.
- Hopwood, D. A. (1976). Genetics of antibiotic production in *Streptomyces*. Microbiology, 1976.

- Lemke, P. A., K. N. Saksema and S. H. Nash (1976). Viruses of industrial fungi. Pages 323 to 337 in K. D. Macdonald, ed., Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Academic Press London and New York.
- Pigac, J. (1975). Disertacija. Tehnološki fakultet, Zagreb.
- Radman, M. (1974). SOS Repair Hypothesis: Phenomenology of an Inducible DNA Repair Which Is Accompanied by Mutagenesis, In: Molecular Mechanisms For Repair of DNA, PART A. Eds.: P. C. Hanwalt and R. E. Setlow. Plenum Publishing Corporation New York.
- Sermonti, G. (1969). Fertility system and genome transfer in *Streptomyces coelicolor*. In G. Sermonti and M. Alačević (eds), Genetics and Breeding of *Streptomyces*, p. 21. Yugoslav Acad. Sci. Arts, Zagreb.
- Sermonti, G. and Casciano (1963). Sexual polarity in *Streptomyces coelicolor*. J. Gen. Microbiol., 33, 393.
- Vaněk, Z., J. Cudlín, M. Blumaerova and Z. Hošťálek, 1971. How many genes are required for the synthesis of chlortetracycline. Folia Microbiol. (Prague) 16: 225-240.
- Vivian, A. and D. A. Hopwood (1973). Genetic control of fertility in *Streptomyces coelicolor* A3 (2): New kinds of donor strains. J. Gen. Microbiol., 76, 147.