

Metody skringu mutantów drobnoustrojów przemysłowych

Edward Galas

Ewa Kwapisz

Jacek Polak

Instytut Biochemii Technicznej

Politechnika Łódzka

Łódź

1. Wstęp

Dynamiczny rozwój technologii mikrobiologicznej syntezy, obserwowany w ostatnich kilkudziesięciu latach, stał się w dużej części możliwy dzięki prowadzeniu w licznych laboratoriach ciągłych, intensywnych badań nad selekcją i doskonaleniem drobnoustrojów, wytwarzających określone bioprodukty. Podstawowym (jak się wydaje nieograniczenie zasobnym) źródłem mikroorganizmów przemysłowych jest środowisko naturalne. Przypuszcza się, że do tej pory z ogromu gatunków drobnoustrojów bytujących w przyrodzie wyizolowano i zbadano zaledwie jeden procent całkowitej ich puli. Niewątpliwie wśród pozostałych, nie znanych dotychczas mikroorganizmów, jest wiele takich, które mogłyby stanowić podstawę do opracowania nowych procesów biotechnologicznych.

Spośród drobnoustrojów izolowanych ze środowisk naturalnych stosunkowo wiele uznawanych jest wstępnie jako „ewentualnie przydatne dla biotechnologii”. Jednakże, zanim zostaną określone mianem „szczepów przemysłowych”, czyli gwarantujących wysoką wydajność biosyntezy określonych produktów, wymagane jest przeprowadzenie skomplikowanych, pracochłonnych zabiegów mających na celu udoskonalenie ich cech technologicznych. Jednym z wyjściowych etapów skringu drobnoustrojów „ewentualnie przydatnych dla biotechnologii” jest wstępne opracowanie warunków biosyntezy, takich jak skład podłoża fermentacyjnego, parametry hodowli i innych. Zasadniczym jednak działaniem w tym zakresie jest wywoływanie trwałych zmian genetycznych w komórkach na drodze ich mutagenizacji z użyciem odpowiednich czynników chemicznych lub fizycznych, albo stosując metodę rekombinacji genetycznej. Większość szczepów produkcyjnych, wykorzystywanych w świecie do mikrobiologicznych syntez i transformacji uzyskano za pomocą pierwszej z wymienionych metod (1-5). Należy zdawać sobie sprawę z tego, że w procesie doskonalenia drobnoustrojów zabiegi mutagenizacji (czy rekombinacji gene-

tycznej) to zaledwie jeden z etapów bardzo pracochłonnej procedury selekcyjnej, określanej jako „skringing w celu udoskonalenia szczepów” (ang. *screening for strain improvement*) (5-7). Procedura ta obejmuje:

- 1) izolowanie, testowanie, a następnie wybór szczepów do mutagenizacji,
- 2) wywoływanie genetycznych zmian w DNA komórek, np. z użyciem czynników mutagennych,
- 3) selekcję i izolowanie z mutowanej populacji komórek, wykazujących pożądaną cechy,
- 4) ocenę wybranych monokultur w próbach fermentacyjnych.

Po dokonaniu wyboru właściwego do mutagenizacji szczepu uwaga eksperymentatora koncentrować się musi na zastosowaniu odpowiednich warunków mutagenizacji (dobrze mutagenu, jego dawki i czasu ekspozycji), gwarantujących uzyskanie możliwie dużej liczby genetycznie zmodyfikowanych komórek. Następne dwa etapy obejmują okres żmudnych prac mających na celu wyłonienie ze zmutowanej populacji kilku najcenniejszych wariantów spośród tysięcy komórek o niepożądaną charakterystyce. Prace te stanowiąc mają uwieńczenie wcześniejszych badań, a opracowanie warunków szybkiej i trafnej selekcji materiału po mutagenizacji nie jest łatwe. Częstość pojawiania się mutacji pozytywnych jest zwykle bardzo niska (rzędu 10^{-4}), a mutanty korzystne są przeważnie szczepami biologicznie słabszymi. W wielu laboratoriach na świecie dzięki współpracy mikrobiologów, biochemików, genetyków oraz technologów opracowano wiele interesujących metod szybkiej selekcji materiału po mutagenizacji, pod kątem różnego typu syntez, transformacji czy biodegradacji. W opracowaniu tym podejmujemy się próby przedstawienia najważniejszych metod selekcji mutantów.

2. Definicja, zasady i formy skringingu drobnoustrojów

Termin „skringing” od kilkunastu lat funkcjonuje w polskiej literaturze naukowej z zakresu medycyny, epidemiologii, ekonomii czy biotechnologii. W biotechnologii pojęcie skringingu drobnoustrojów przemysłowych definiowane jest jako kompleksowe postępowanie, obejmujące zespół selektywnych zabiegów mających na celu a) wykrycie i wyizolowanie spośród dużej liczby drobnoustrojów tylko tych, które są celem badań oraz b) określenie ich przydatności dla danego bioproduktu (8). Szczepy drobnoustrojów przemysłowych są poddawane zabiegom skringingu właściwie w sposób ciągły: po raz pierwszy — w fazie ich pozyskiwania ze środowiska bytowania, następnie podczas zabiegów doskonalenia ich cech, i później ponownie podczas wykorzystywania szczepów w konkretnych technologiach, gdzie zabieg ten stanowi podstawową procedurę, umożliwiającą okresową kontrolę jednorodności i metabolicznej aktywności populacji.

Prace w zakresie poszukiwania skutecznych metod skringingu drobnoustrojów w fazie doskonalenia ich cech technologicznych rozpoczęto już w latach czterdziestych naszego stulecia, w ramach kompleksowego programu badaw-

czego zleconego przez rząd Stanów Zjednoczonych A P, a dotyczącego poszukiwań drobnoustrojów efektywnie produkujących penicylinę (9). Eksperymenty objęte programem badań, prowadzone równolegle w wielu niezależnych laboratoriach, polegały na wykonywaniu rozsiewów „naturalnych” (nie mutowanych) populacji szczepów *Penicillium chrysogenum* i izolowaniu wariantów o zwiększonej produktywności penicyliny. Po osiągnięciu wydajności, ograniczonej ramami naturalnej zmienności szczepów, kilkadziesiąt wybranych selektantów poddano wielokrotnej mutagenizacji promieniami UV lub X, iperytem lub nitrozoguanidyną. W trzech głównych liniach selekcyjnych wykorzystywano mutanty różniące się morfologicznie (m.in. pozbawione pigmentu). W ramach tych badań określono cechy wielu dziesiątków tysięcy klonów w zróżnicowanych warunkach rozsiewu na podłożach stałych oraz w próbach fermentacyjnych. Końcowy efekt tych zmagających był znakomity (ponad tysiąc-krotne zwiększenie wydajności), choć wzrost produktywności obserwowany w kolejnych etapach doskonalenia szczepów nie przekraczał zwykle 10-15%. Obserwacje poczynione podczas realizacji tego programu stanowiły podstawę do opracowania technologii produkcji innych antybiotyków. Wykorzystano je również w przygotowaniach technologii produkcji enzymów, kwasów organicznych, aminokwasów, witamin, polisacharydów, giberelin, nukleotydów. Główne wnioski wynikające z prac związanych z realizacją tego programu, zebrane w pracy Elandera (9), są następujące:

1. Znakomita większość wariantów uzyskiwanych w wyniku działania mutagenów wykazuje zwykle niższą zdolność do biosyntezy antybiotyku w porównaniu z populacją wyjściową. Ze względu na niski udział wariantów pozytywnych w zmutowanej populacji, konieczne jest opracowanie efektywnych metod selekcji mutantów, a oznaczenia aktywności izolatów muszą być prowadzone bardzo precyzyjnie.

2. Efekty mutagenizacji zależą w dużym stopniu od użytej dawki mutagenu. Warianty o zwiększonej produktywności danego metabolitu są zwykle izolowane z populacji traktowanych średnimi dawkami czynników mutagennych. Wyższe stężenia mutagenu sprzyjają powstawaniu mutantów wyraźnie różniących się od szczepu wyjściowego, np. gromadzących inne metabolity.

3. Warianty o podwyższonej produktywności antybiotyku wykazują zwykle morfologię szczepu wyjściowego. Mutanty o zmienionej morfologii mogą okazać się lepszymi producentami antybiotyku w zmienionych warunkach hodowli.

4. W przypadku poszukiwania mutantów gromadzących dany metabolit w podwyższonych ilościach, powinno się poddawać skринingowi mniejszą liczbę wariantów w szerszej gamie zróżnicowanych warunków.

5. Szczególnie precyzyjnej oceny aktywności wymagają warianty poddawane wielokrotnym zabiegom mutagenizacji, dla których przyrosty wydajności biosyntezy antybiotyku po kolejnych zabiegach nie przekraczają 10-15%, tj. są porównywalne z efektami naturalnej selekcji.

6. Stabilność wyselekcjonowanych mutantów może się wyraźnie różnić od stabilności szczepu wyjściowego. Niekiedy trzeba opracować inne, indywidualnie dobrane warunki przechowywania tych kultur.

7. Szczepy uznane w laboratoriach za bardzo dobre niekoniecznie uzyskują podobną ocenę w warunkach przemysłowych. O ich przydatności rozstrzygają długotrwałe i wnikliwe badania w skali pilotowej.

Widać zatem, że powodzenie w pracach nad doskonaleniem cech drobnoustrojów za pomocą metod mutagenizacji to nie tylko dobór warunków wykonywania tego zabiegu, ale i zastosowanie odpowiednich metod selekcji materiału po mutagenizacji. Przez wiele lat klasyfikację monokultur otrzymywanych po mutagenizacji prowadzono stosując metodę rozsiewów na płytki zawierające typowe podłoża wzrostowe. Selekcjonowanie materiału po mutagenizacji w tych warunkach miało charakter skringingu losowego (ang. *random screening*). Próby takie porównać można z „poszukiwaniem igły w stogu siana”. W miarę postępu badań nad drogami biosyntezy poszczególnych metabolitów i mechanizmami regulującymi te przemiany, zwiększają się możliwości opracowania bardziej efektywnych metod skringingu populacji. Metody te określane są przez Elandera (6) terminem — racjonalny skringing (ang. *rational screening*). Polegają one na prowadzeniu rozsiewów populacji w tak dobranych warunkach, aby preferowane były wzrost i ujawnianie się cech mutantów korzystnych, a możliwości wzrostu klonów niepożądanych były ograniczone.

3. Skringing losowy

Skringing losowy to metoda badań populacji w warunkach typowych dla jej wzrostu i biosyntezy określonego metabolitu. Stosowany jest w przypadkach braku odpowiednich kryteriów, na podstawie których można by w prosty sposób, np. opierając się na obserwacjach morfologii koloni wyróżnić spośród otrzymywanych monokultur, warianty pozytywne. Typowym przykładem tej formy skringingu jest rozsiew badanej populacji na stałe podłoże, izolowanie wybieranych losowo, nie różniących się morfologicznie kolonii i sprawdzanie ich aktywności w próbach fermentacyjnych. Losowy wybór kolonii do dalszych badań niesie ze sobą wysokie prawdopodobieństwo „zgubienia” pozytywnych wariantów. Ponieważ zwykle dąży się, aby liczba testowanych monokultur była jak największa, zabiegi te stają się bardzo pracochłonne i żmudne, a przy braku szczęścia — nieefektywne.

Niekiedy istnieje możliwość pewnego usprawnienia tych badań, dzięki zastosowaniu odpowiednich substratów lub wskaźników w podłożu testowym, powodujących pojawianie się wokół kolonii barwnych stref, wskazujących na występowanie określonej aktywności metabolicznej poszczególnych monokultur. Przykładowo, dodatek do podłoża takich substratów, jak skrobia, czy kazeina umożliwia obserwację jaśniejszych stref wokół kolonii produkujących odpowiednio α -amylazę, bądź proteiny (10,11). Na użytek badań skringingowych produkowanych jest wiele chemicznie modyfikowanych, barwnych substratów, takich jak: *starch-azure*, *blue-dextran*, *blue-cellulose*, itp.

Ocenę monokultur badanych w ramach skringingu losowego można ułatwić, wprowadzając do podłoża selekcyjnego określone wskaźniki. Do selekcji szcze-

pów produkujących kwasy organiczne stosuje się podłoża z dodatkiem błękitu bromofenolowego lub czerwieni obojętnej (12). Selekcję drobnoustrojów wydzielających enzymy amylolityczne prowadzi się zraszając płytki z koloniami wyrosłymi na podłożu skrobiowym roztworem jodu (10,11). Identyfikację drobnoustrojów produkujących antybiotyki można przeprowadzać na płytkach, na które oprócz badanej populacji wysiewa się kulturę wrażliwą na określony antybiotyk (9). Prowadzenie pomiarów średnic stref wydzielania bioproduktu wokół kolonii badanych populacji jest użyteczne tylko w początkowych stadiach doskonalenia drobnoustrojów. Zależność między średnicą strefy i odpowiadającą jej aktywnością metaboliczną jest funkcją malejącą wykładniczo. Podczas doskonalenia populacji wykazującej wysoką aktywność wyjściową, dokładność pomiaru jest bardzo niska, bowiem ewentualne różnice średnic stref wokół kolonii są często niezauważalne.

Ocenę monokultur ułatwić może również zastosowanie podłoży limitujących wzrost, dodawanie do nich substancji degradujących wydzielany produkt, skracanie czasu inkubacji, itp. (5).

Znaczny błąd pomiarów wielkości stref mogą powodować różnice w morfologii kolonii. Wielkość stref wokół małych, zwartych kolonii jest zwykle zaniżona w stosunku do wykazywanej przez nie aktywności. Kolonie rozległe, pełzające po powierzchni pożywki, dają zwykle strefy większe, niż by to wynikało z ich aktywności. Ball i McGonagle (13) proponują dla uniknięcia tego błędu obliczanie wskaźnika aktywności (ang. *potency index*), wyrażonego stosunkiem średnicy strefy do średnicy kolonii. Dokładniejszymi, choć bardziej pracochłonnymi sposobami badania populacji, są metody oparte na elucji z pożywki okalającej kolonię wydzielanych przez nią metabolitów. Poddanie eluatu, np. analizie chromatograficznej umożliwia przeprowadzenie analizy ilościowej i jakościowej wydzielanych produktów (14).

Precyzyjniejszą formą skringingu losowego populacji drobnoustrojów jest określenie aktywności poszczególnych monokultur w warunkach hodowli wgłębnej. Hodowle te prowadzi się najczęściej na wytrząsarkach, stosując kolby stożkowe o pojemności 100-500 ml. Podstawową zaletą tej formy skringingu jest duża dokładność, jak również możliwość wstępnego doboru podłoża i intensywności natleniania, czyli głównych parametrów pomocnych w powiększaniu skali procesu biosyntezy. Do najbardziej żmudnych i pracochłonnych należy następny etap selekcji — ocena i klasyfikacja szczepów na podstawie ich aktywności w obecności różnych źródeł węgla, azotu, fosforu, prekursorów biosyntezy, itp. Liczba prób kierowanych jednocześnie do badań jest często ograniczona możliwościami technicznymi w laboratorium.

W sytuacjach, gdy ulepszone warianty uzyskuje się z niską częstotliwością i metody badania aktywności klonów są mało dokładne, zalecane jest prowadzenie tzw. wieloetapowego skringingu (ang. *multi-level screening*) (15,16). Przykładem jego stosowania są prace Calama (15) i Daviesa (16) mające na celu uzyskanie szczepów *Penicillium* o zwiększonej aktywności antybiotykotwórczej. Skringing wieloetapowy polega na wykonywaniu serii selekcji, przy czym do kolejnych zabiegów kierowana jest stosunkowo duża liczba izolatów wybieranych

w poprzednich etapach badań. Poszczególne etapy skringingu mają na celu eliminowanie najsłabszych monokultur, a nie wybór najlepszych wariantów. Niekiedy stopień ulepszenia szczepu uzyskiwany w wyniku mutagenizacji jest mniejszy od błędu, jakim obarczone jest badanie. W takich przypadkach poleca się prowadzenie tzw. „szybkich powtórek” (ang. *rapid recycling*), które polegają na wielokrotnym powtarzaniu zabiegu mutagenizacji i selekcji (15–18). Przykładowe postępowanie przy stosowaniu tej metody może obejmować kolejno: mutagenizację, wstępną selekcję, ponowną mutagenizację mieszaniny uzyskanej ze wstępnie wyselekcjonowanych klonów oraz wieloetapowy skringing.

4. Racjonalny skringing

Dzięki postępowi wiedzy z zakresu genetyki i fizjologii drobnoustrojów, a także wskutek lepszego poznania szlaków biosyntezy określonych produktów i mechanizmów regulacji metabolizmu, możliwe stało się opracowanie bardzo efektywnych, racjonalnych metod skringingu szczepów. Duże znaczenie dla rozwoju tych metod ma dokonujący się równoległe postępy w dziedzinie technik badawczych, umożliwiających szybką analizę jakościową i ilościową wydzielanych bioproduktów, miniaturyzację i automatyzację oznaczeń oraz wykorzystanie sterowania za pomocą mikroprocesorów.

Procedura „racjonalnego skringingu” polega na podobnym postępowaniu, jak w przypadku skringingu losowego, z tym, że racjonalna jego forma prowadzona jest w warunkach, które ograniczają wzrost niepożądanych kultur lub limitują ujawnianie się niekorzystnych cech, a tym samym ułatwiają selekcję monokultur najcenniejszych. Elander (6), w opracowaniu z 1979 r. sklasyfikował najważniejsze z publikowanych dotąd metod racjonalnego skringingu w dwóch grupach metod: bezpośrednich i pośrednich.

4.1. Metody bezpośrednie racjonalnego skringingu

Bezpośrednie metody racjonalnego skringingu opierają się na określeniu zasadniczego parametru decydującego o powodzeniu skringingu — czyli produktywności szczepów. W tym przypadku jednak warunki doświadczenia dobiera się tak, by produktywność ta była w pewnym stopniu ograniczana, dając szansę łatwiejszego wykrycia klonów superproducentów. Wydaje się, że jedną z najkorzystniejszych metod prowadzenia tej formy skringingu są hodowle w warunkach chemostatu, w podłożach zawierających, np. substrat biosyntezy w stężeniu limitującym wydzielanie produktu lub z dodatkiem innych substancji, determinujących proces biosyntezy (19). Ta forma skringingu może być również wykorzystana podczas poszukiwań szczepów wykorzystujących tańsze, mniej oczyszczone, odpadowe surowce.

Szczególnym przykładem bezpośrednich metod racjonalnego skringingu jest selekcja, mająca na celu poszukiwanie rewertantów mutantów o znacznie

ograniczonej produktywności. Skryning ten odbywa się w dwóch etapach. Etap pierwszy polega na identyfikacji i izolowaniu z populacji poddanej mutagenizacji jak największej liczby klonów o znacznie zredukowanej zdolności do produkcji danego metabolitu. W drugim etapie te „nie produkujące” komórki poddaje się powtórnej mutagenizacji. Postępowanie to stwarza szansę uzyskania rewertantów dwukrotnie zmutowanych w genach bezpośrednio związanych z tworzeniem produktu. Pierwsza mutacja uszkadza drogi biosyntezy; druga, tłumiąc efekt pierwszej, spowodować może znaczny wzrost produktywności szczepu. Z powodzeniem technikę tę zastosowali Dulaney i Dulaney (20) oraz Unowsky i Hoppe (21) uzyskując rewertanty *Streptomyces* wydajnie produkujące antybiotyki.

4.2. Metody pośrednie racjonalnego skryningu

Często ogniwem pośrednim racjonalnego skryningu jest selekcja szczepów w warunkach mających na celu wykrycie innych (poza produktywnością) cech wpływających w sposób zasadniczy na wydajność biosyntezy określonego produktu. Zabiegi te prowadzi się często w warunkach letalnych dla niepożądanych kultur, co wzbogaca populację w mutanty o pozytywnych cechach. Metody pośrednie racjonalnego skryningu obarczone są często dużym błędem, dlatego też wykorzystuje się je najczęściej do wstępnej selekcji materiału po mutagenizacji, a właściwą ocenę wybranych klonów prowadzi się poprzez określenie poziomu produktywności, najczęściej w warunkach hodowli węgłnej.

Pośrednie formy racjonalnego skryningu mogą polegać na:

- detekcji i (lub) rewersji auksotrofii,
- poszukiwaniu mutantów konstytutywnych,
- obniżeniu stopnia inhibicji produktem końcowym,
- obniżeniu poziomu katabolicznej represji,
- zwiększeniu oporności w stosunku do toksycznych analogów intermediałów metabolizmu,
- wzroście aktywności detoksykacyjnej,
- obniżeniu wrażliwości w stosunku do wybranych składników pożywek lub prekursorów,
- selekcji mutantów o korzystnej morfologii,
- selekcji mutantów o zwiększonej przepuszczalności ściany komórkowej.

4.2.1. Detekcja i rewersja auksotrofii

Często w badaniach skryningowych populacji szczególną uwagę zwraca się na mutanty auksotroficzne. Auksotroficzne mutacje w centralnym szlaku metabolicznym mogą dostarczać prekursorów dla interesujących syntez, zarówno metabolitów pierwszo-, jak i drugorzędowych.

Do syntezy ważnych z przemysłowego punktu widzenia aminokwasów, m.in. lizyny, kwasu glutaminowego czy argininy, wykorzystywane są głównie

homoserynozależne mutanty *Corynebacterium glutamicum* i *Brevibacterium flavum* (22). Skringing mutantów *Bacillus subtilis*, wymagających do wzrostu AMP i GMP pozwolił na uzyskanie szczepów efektywnie gromadzących nukleotydy purynowe (23).

Wpływ mutacji auktotroficznych na produkcję drugorzędowych metabolitów często jest trudny do jednoznacznego wyjaśnienia. Zaobserwowano, że takie mutacje powodują częściej obniżenie wydajności biosyntezy tych związków, niż jej podwyższenie. Przyczyną tej prawidłowości mogą być zakłócenia w syntezie prekursorów drugorzędowych metabolitów. Ograniczenie syntezy aktynomycyny u auktotroficznych mutantów *Streptomyces antibioticus*, badanych przez Polsinelli i współ. (24), uzasadniane było blokadą syntezy jej prekursorów — izoleucyny, waliny, treoniny. Większa tego typu współzależność ma miejsce w przypadku szczepów *Penicillium chrysogenum*, wydzielających zarówno lizynę, jak i penicylinę. Wspólnym metabolitem pośrednim w tych syntezach jest L-aminoadypinian. Auktotrofy lizynowe uznawane są aktualnie jako potencjalne źródło dobrych producentów penicyliny. Wyniki badań nad tego typu mutantami opisane są m.in. w pracy Luengo i współ. (25).

Trudna do wyjaśnienia jest również współzależność zmian produktywności drugorzędowych metabolitów przez auktotroficzne mutanty z ich wymaganiami pokarmowymi, szczególnie w odniesieniu do substancji nie związanych z syntezą tych metabolitów lub ich prekursorów. Przyjmuje się, że te powiązania wynikają z istnienia mechanizmów regulacji między różnymi drogami metabolicznymi (ang. *cross-pathway regulation*), lub występowania dodatkowej mutacji związanej z tą auktotrofią (26).

W badaniach nad doskonaleniem drobnoustrojów auktotrofia wykorzystywana jest również jako łatwy do wykrycia wskaźnik zaistnienia mutacji. Technika ta może być użyteczna, np. podczas mutagenizacji bakterii N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidyną, gdzie w rejonie widełek replikacyjnych może występować grupa mutacji (27). Detekcja auktotrofii w połączeniu z mapowaniem wybranej grupy genów związanych z daną biosyntezą może doprowadzić do wykrycia cennych mutantów.

Skrining w kierunku wykrycia auktotrofii może również prowadzić do wyeliminowania niepożądanych odgałęzień szlaków metabolicznych oraz mechanizmów represji i hamowania podstawowych reakcji szlaku biosyntezy na zasadzie sprzężenia zwrotnego.

Selekcja w kierunku rewersji auktotrofii może doprowadzić do wyizolowania szczepów superproducentów określonych drugorzędowych metabolitów. Rewersji auktotrofii towarzyszyć bowiem może np. podwojenie części chromosomu, czyli zwiększenie „dawki genu” odpowiedzialnego za produkcję danego metabolitu (28). Przykładem sukcesu tej formy skringingu mogą być badania Polsinelli i współ. (24) nad rewertantami izoleucynozależnych mutantów *Streptomyces antibioticus* produkujących ze zwiększoną wydajnością aktynomycynę, w porównaniu nie tylko z auktotroficzną formą szczepu, ale i ze szczepem rodzicielskim.

4.2.2. Selekcja mutantów konstytutywnych

Terminem „mutanty konstytutywne” określane są szczepy, u których mutagenizacja wywołała niezależną od obecności induktora bądź represora ekspresję genów związanych z biosyntezą wybranych enzymów. Demain (29) poleca następujące metody selekcji tego typu mutantów:

1. Izolacja w warunkach hodowli ciągłej — chemostatu, gdzie substratem limitującym jest induktor syntezy enzymu, użyty w stężeniu niższym od tego, jakie jest wymagane dla indukcji biosyntezy.

2. Przemienne przesiewy populacji na podłoża z dodatkiem i bez dodatku induktora.

3. Stosowanie substratu, który jest słabym induktorem produkcji określonego białka.

4. Selekcja mutantów w pożywce zawierającej zarówno induktor syntezy jak i represor tej indukcji.

5. Wykorzystanie reakcji barwnych dla identyfikacji konstytutywnych mutantów spośród kolonii wyrosłych na stałym podłożu, zawierającym pokrewny substrat, nie będący induktorem syntezy enzymu.

Technikę opisaną w punkcie piątym wykorzystał Demain (29) do selekcji konstytutywnych mutantów produkujących β -galaktozydazę, rozsiewając populację na podłożu z glicerolem i zraszając kolonie roztworem o-ortonitrofenylo- β -D-galaktozydu. Kolonie konstytutywnych mutantów degradujące substrat przyjmują żółte zabarwienie uwalnianego w reakcji o-nitrofenolu.

4.2.3. Selekcja mutantów w kierunku obniżenia stopnia inhibicji produktem końcowym

Zastosowanie tej formy skringu wykorzystującej obecność produktu (lub jego analogu) w pożywce selekcyjnej w odpowiednio wysokim stężeniu jest użyteczne przede wszystkim w początkowych etapach prac nad doskonaleniem drobnoustrojów produkcyjnych, tj. przed rozpoczęciem zasadniczych działań skierowanych ku zwiększeniu ich produktywności. Szczególnie ważne, jak się wydaje, jest nabycie zwiększonej oporności w stosunku do takich produktów, jak np. antybiotyki, których obecność w podłożu w tropofazie może wpływać negatywnie na wzrost drobnoustroju, by następnie w idiofazie ograniczać syntezę produktu. Rola i efekty tej formy skringu dla drobnoustrojów wydzielających nystatynę, streptomycynę i rystomycynę opisane są odpowiednio w pracach Dolezilovej (30), Woodruffa (31) oraz Treniny i Trutnevej (32). Pozytywny efekt przynieść może również selekcja w kierunku podwyższenia oporności w stosunku do prekursorów metabolitów drugorzędowych. Polya i Nyiri (33) uzyskali szczepy *Penicillium chrysogenum* produkujące zwiększone ilości penicyliny, dzięki nabyciu przez nie podwyższonej oporności w stosunku do kwasu fenylooctowego.

4.2.4. Selekcja w kierunku ograniczenia wpływu represji katabolicznej

Celem tego typu selekcji jest wyizolowanie mutantów zachowujących zdolność do syntezy danego enzymu mimo obecności w podłożu łatwo przyswajalnego źródła węgla, czyli w warunkach sprzyjających przede wszystkim szybkiemu i obfitemu wzrostowi szczepu. Jedną z najczęściej stosowanych metod selekcji tego typu mutantów jest hodowla populacji na podłożach zawierających łatwo przyswajalne źródło węgla w dużych stężeniach oraz substrat dla danego enzymu. W tych warunkach Sikyta i współ. (19) izolowali mutanty *E. coli* odporne na kataboliczną represję, produkujące deaminazę serynową. Skринing prowadzono w warunkach chemostatu, z użyciem glukozy jako źródła węgla i D-seryny, jako limitującego substratu azotowego.

Efekty selekcji szczepów rodzaju *Bacillus* prowadzonych pod kątem zwiększenia ich aktywności amylazotwórczej, polegających na rozsiewie populacji na podłoża z glukozą lub deoksyglukozą przedstawione są w pracach Saito i Yamamoto (34), Galasa i współ. (35), Fiedurka i współ. (36), Hodgsona (37) i Gosha (38).

4.2.5. Selekcja mutantów opornych w stosunku do toksycznych analogów metabolitów pośrednich

Technika selekcji mutantów opornych w stosunku do toksycznych analogów metabolitów pośrednich ma na celu ułatwienie wyizolowania mutantów regulatorowych, u których zakłócony lub wyeliminowany został system kontroli metabolicznej na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Chodzi o uzyskanie szczepów nie rozpoznających konkretnych inhibitorów przemian i wykazujących tym samym stałą derepresję syntezy enzymów danego szlaku. Cel ten może być osiągnięty przez prowadzenie skринingu mutantów w obecności toksycznych analogów odpowiednich, np. aminokwasów czy nukleotydów (pełniących rolę tych inhibitorów). Nabycie trwałej oporności w stosunku do tych analogów może stać się genetyczną przyczyną nadprodukcji określonych metabolitów pierwszorzędowych, np. aminokwasów, ponieważ zniesienie systemu regulacji pociąga za sobą podwyższenie ilości lub katalitycznej aktywności odpowiednich enzymów. Według danych zawartych w pracy Stanbury i Whitakera (39) uzyskanie tą drogą cennych mutantów będzie skutkiem:

- po pierwsze — wyizolowania mutantów zachowujących zdolność do wzrostu, mimo obecności toksycznego analogu, co oznaczać może sytuację, w której analog ten nie był bezpośrednio włączany do szlaku metabolicznego, a jedynie naśladował funkcje regulatora metabolizmu;
- po drugie — spełnienia warunku, że nabyta oporność w stosunku do analogu i związane z nią zwiększenie aktywności enzymów, zachowane zostaną również w stosunku do substancji podstawowej;
- po trzecie — faktu, że wzrost drobnoustrojów w obecności toksycznego analogu nie wynikał z nabycia przez szczep zdolności do jego degradacji.

W literaturze podawane są liczne przykłady uzyskania tą drogą cennych mutantów regulatorowych, wydzielających zwiększone ilości aminokwasów. Wśród najważniejszych wymienić należy prace Sano i Shiio (40), dotyczące mutantów *Brevibacterium flavum* produkujących lizynę oraz prace Kubota (41), odnośnie do izolacji mutantów gromadzących argininę.

Technika izolowania mutantów regulatorowych, nie rozpoznających inhibitorów określonych przemian może być również zaadaptowana w poszukiwaniach mutantów — superproducentów metabolitów drugorzędowych. Problem ten omówiono wnikliwie w pracy Stanbury i Whitakera (39). Autorzy podają, że uzyskanie wydajnych producentów metabolitów drugorzędowych może być skutkiem, między innymi:

a) wywołania oporności w stosunku do analogu metabolitu pierwszorzędowego, będącego jednocześnie prekursorem metabolitu drugorzędowego,

b) zniesienia regulacji syntezy na zasadzie sprzężenia zwrotnego przez metabolit wtórny.

Ilustracją pozytywnej selekcji mutantów opisanych w punkcie a) mogą być prace prowadzone przez Martina i współ. (42), Godfrea (43), Changą i Elan-dera (44).

Badania prowadzone przez Martina i współ. (42) doprowadziły do wyizolowania mutantów produkujących zwiększone ilości kandycydyny. U mutantów tych dzięki selekcji w obecności analogu tryptofanu zniesiona została kontrola biosyntezy antybiotyku przez tryptofan. Wyizolowane przez Godfrey'a (43) w obecności analogu waliny — trifluoroleucyny mutanty *Streptomyces lipmanii* produkowały zwiększone ilości cefamycyny. Zwiększoną produkcję cefalosporyny wykazywały mutanty *Acremonium chrysogenum*, u których w wyniku selekcji w obecności analogu metioniny zniesiono stymulujący wpływ tego aminokwasu na biosyntezę antybiotyku (44).

Mechanizm opisany w punkcie b) dotyczy przypadku, gdy gromadzony w podłożu drugorzędowy metabolit sam ogranicza własną syntezę, pozostając bez większego wpływu na wzrost i metabolizm komórki w szerokim tego słowa znaczeniu. Efekty selekcji w obecności analogów antybiotyków prowadzone pod kątem zwiększenia wydajności biosyntezy takich antybiotyków jak: kandycydyna lub penicylina opisane są w pracach Liu (45) i Gordee i Day (46).

4.2.6. Selekcja mutantów o właściwościach detoksykacyjnych

Skrining populacji pod kątem selekcji mutantów wykazujących podwyższoną zdolność do neutralizacji związków toksycznych dla wzrostu jest jedną z częściej stosowanych form pośredniego, racjonalnego skringingu. Mechanizmy nabywania przez szczepy podwyższonej aktywności detoksykacyjnej i powiązanie tej cechy z określoną produktywnością są różne w zależności od szczepu i typu biosyntezy. Skringing polega na wprowadzeniu do pożywki selekcyjnej określonej substancji toksycznej w stężeniu najmniejszym — hamującym wzrost, a następnie izolowanie klonów wykazujących wzrost, mimo jej obecności. Na tego typu podłożach można wielokrotnie powtarzać rozsiewy,

zwiększając stężenia substancji toksycznych. Ta forma skringingu sprawdziła się w doskonaleniu szczepów produkujących antybiotyki β -laktamowe (47). Skringing polegał na izolowaniu klonów o podwyższonej tolerancji na obecność hydroksyloaminy, imidazolu lub metali ciężkich.

Stosując tę technikę uzyskano również znaczny postęp w doskonaleniu szczepów rodzaju *Bacillus* o wysokiej aktywności amylazotwórczej (48,49). Skringing polegał na izolowaniu klonów charakteryzujących się zwiększoną opornością w stosunku do wybranych antybiotyków: tunikamycyny, ampicyliny, streptomycyny i cykloseryny. Sasaki i współ. (48) w wyniku mutagenizacji szczepu *Bacillus subtilis* NA 64 nitrozoguanidyną i selekcji w pożywce z tunikamycyną uzyskali mutantą, produkującego α -amylazę z wydajnością pięciokrotnie wyższą w porównaniu ze szczepem wyjściowym. Mutagenizacja *Bacillus licheniformis* nitrozoguanidyną i selekcja w pożywkach z tunikamycyną, cykloseryną lub ampicyliną doprowadziły do wyizolowania przez Galasa i współ. (49) mutantów, produkujących α -amylazę z wydajnością ponad dwukrotnie wyższą w stosunku do szczepu wyjściowego. Współzależność między aktywnością amylazotwórczą, a ich zwiększoną opornością w stosunku do wybranych antybiotyków wykazano również w pracach Yoneda (50) i Hito-suyanagi i współ. (51).

4.2.7. Selekcja w kierunku obniżenia wrażliwości szczepów w stosunku do wybranych składników pożywek lub prekursorów

Przykładem celowości prowadzenia skringingu mającego na celu obniżenie wrażliwości szczepu na wysokie stężenia określonych składników pożywki jest biosynteza antybiotyków przez szczepy rodzaju *Streptomyces*. Gromadzenie produktu przez te szczepy jest uwarunkowane zachowaniem określonego stężenia jonów fosforanowych w podłożu. Selekcja mutantów w pożywkach z dodatkiem dużych stężeń tych jonów lub ich toksycznych analogów (arsenianów, wanadanów) może prowadzić do wyizolowania szczepów o ograniczonej tego typu regulacji. Wyniki badań nad tym zagadnieniem przedstawione są w pracach Martina (52) oraz Bowmana i współ. (53).

Innym przykładem tej formy selekcji jest izolowanie mutantów *Penicillium chrysogenum* o ograniczonej wrażliwości na kwas fenylooctowy — będący prekursorem biosyntezy penicyliny G. Związek ten w wyższych stężeniach jest toksyczny dla wzrostu szczepu, natomiast użycie prekursora w niższych stężeniach — ogranicza biosyntezę (33).

W procesach tlenowych bardzo ważną z ekonomicznego punktu widzenia jest możliwość ograniczenia poziomu natleniania środowiska fermentacyjnego. Tlen stanowi często najdroższą pożywkę w tych procesach. Zasadne jest zatem selekcionowanie szczepów zachowujących zdolność do wydajnej biosyntezy produktów w warunkach niższego natlenienia. Na uwagę zasługują tu wyniki uzyskane z prac prowadzonych przez Mindlina i Zaitzevej (54), którzy wyizolowali szczep wydajnie wydzielający lizynę w warunkach ograniczonego natlenienia, w których produktywność szczepu rodzicielskiego była o połowę niższa.

4.2.8. Selekcja mutantów o korzystnej morfologii

Ekonomika i łatwość operacji procesu biotechnologicznego, prowadzonego w warunkach wglębnych uwarunkowane są często morfologią drobnoustroju. Problem ten dotyczy szczególnie hodowli grzybów strzępkowych, których zawiesiny wykazują zwykle właściwości w znacznym stopniu nienewtonowskie i wysoką lepkość pozorną. Zmienianie się wartości lepkości, w zależności od szybkości ścinania podczas hodowli w fermentorze, oznacza występowanie stref o względnie niskiej lepkości w pobliżu mieszadła i stref o bardzo wysokiej lepkości w pobliżu ścianek fermentora. Z technologicznego punktu widzenia niekorzystna morfologia grzybni może powodować znaczne ograniczenie szybkości wnikania tlenu, może sprzyjać koagulacji pęcherzyków gazu, zwiększając zapotrzebowanie mocy na mieszanie. Zagadnienia te w kontekście biosyntezy penicyliny przez szczepy rodzaju *Penicillium* są analizowane w pracy Balla (55), a w odniesieniu do produkcji kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger*, między innymi w pracach Kwapisz (56) oraz Budzyńskiego (57). Zdolność drobnoustroju do wzrostu w danej formie morfologicznej zależy od jego genotypu oraz od warunków hodowli. Na podstawie danych uzyskanych przez Hamlyna i Balla (58) dla uzyskania szczepów o właściwym genotypie, bardziej skuteczne jest zastosowanie technik rekombinacji genetycznej, niż tradycyjnych programów mutacji i selekcji. Wymienieni autorzy uzyskali szczepy *Cephalosporium acremonium* o wymaganej morfologii dzięki zastosowaniu fuzji protoplastów.

Zagadnienie otrzymywania szczepów o właściwej morfologii jest również ważne dla procesów prowadzonych z użyciem drożdży. Zdolność szczepu produkcyjnego do flokulacji determinuje, np. technologię produkcji piwa (piwa górnej i dolnej fermentacji) i stanowi jeden z najważniejszych parametrów decydujących o efektywności produkcji etanolu w warunkach zwiększonego stężenia biomasy (59).

4.2.9. Skryning w kierunku zwiększenia przepuszczalności ściany komórkowej

Z danych literaturowych wynika, że niekiedy czynnikiem ograniczającym wydajność biosyntezy jest zbyt niska szybkość transportu bioproduktu przez błonę cytoplazmatyczną, czy ścianę komórkową. Spowodowanie mutacji obejmujących zmiany struktury błon komórkowych nie gwarantuje wprawdzie wzrostu szybkości wydzielania metabolitów, zwiększa jednak prawdopodobieństwo wystąpienia tego zjawiska. Punkt wyjścia do dyskusji na ten temat stanowią prace prowadzone przez Kinoshitę i Nakayamę (22), Udagawę i współ. (60) i Nakao i współ. (61), w których autorzy wskazują na wyraźny wpływ biotyny (modyfikującej przepuszczalność ściany komórkowej) na produkcję kwasu glutaminowego przez *Corynebacterium glutamicum*.

Poziom przepuszczalności błony cytoplazmatycznej, czy ściany komórkowej pozostaje w ścisłej korelacji z opornością komórek na toksyczne związki. Po-

zytywne efekty przyniósł skring populacji grzybów strzępkowych w kierunku oporności w stosunku do antybiotyków polienowych (25,62) oraz szczepów *Streptomyces* w kierunku zwiększenia oporności na aktynofagi (62). Rola penicyliny jako modyfikatora przepuszczalności ściany komórkowej drobnoustrojów przemysłowych omawiana jest w pracy Wanga i współl. (63).

5. Podsumowanie

Przedstawiony w pracy przegląd metod racjonalnej selekcji komórek drobnoustrojów poddanych mutagenizacji nie jest kompletny. W opracowaniu skupiono się przede wszystkim na metodach umożliwiających szybką ocenę ważnych cech dla biotechnologii, takich jak: wysoka produktywność, wysoka oporność w stosunku do wybranych składników pożywek, prekursorów lub analogów pośredników metabolizmu, ograniczona podatność na substratową indukcję, kataboliczną represję, czy hamowanie produktem, właściwa morfologia i zwiększona przepuszczalność ściany komórkowej. Zestaw metod stosowanych do selekcji mutantów z pewnością będzie się poszerzać wraz z rozwojem badań nad mechanizmami mutagenyzy, ekspresji genów i regulacji dróg metabolicznych.

Osobnego omówienia wymagają zasady i metody selekcji drobnoustrojów doskonalonych za pomocą metod inżynierii genetycznej oraz prowadzenie prac selekcyjnych w zautomatyzowanych, zminiaturyzowanych i skomputeryzowanych układach.

Literatura

1. Glaser D. A., (1976), Symposium: Automated Microbiology, Dev. Microbiol., 17, 139-156.
2. Hopwood D. A., Merrick M. J., (1977), Bacteriol. Rev., 41, 595-635.
3. Mandal S. K., Dey P. K., Singh M. P., Roy D. K., (1983), J. Food Sci. Technol., 20, 30-32.
4. Normansell I. D., (1982), J. Chem. Technol. Biotechnol., 32, 296-303.
5. Rowlands R. T., (1984), Enzyme Microb. Technol., 6, 3-10.
6. Elander R. P., (1979), in: *Proceedings of the Third International Symposium the Genetic of Industrial Microorganisms (GIM78)*, Eds. Sebek O. K., Laskin A. I., American Society for Microbiology, Washington DC, 24-35.
7. Rowlands R. T., (1984), Enzyme Microb. Technol., 6, 290-300.
8. Chmiel A., (1991), *Biotechnologia, Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, PWN, Warszawa, 231-259.
9. Elander R. P., (1987), in: *Microbial Screening, Selection and Strain Improvement, Basic Biotechnology*, Eds. Bu'Lock J., Kristiansen B., Academic Press, London, 217-251.
10. Ingle M. B., Erickson R. J., (1978), Adv. Appl. Microbiol., 24, 257-278.
11. Kwapisz E., Jakubowski A., Galas E., (1984), Materiały XX Zjazdu PTBioch., Olsztyn, 58.
12. Smith J. E., (1975), in: *The Filamentous Fungi*, Ed. Arnolds, London, 1.
13. Ball C., McGonagle M. P., (1978), J. Appl. Bacteriol., 45, 67-74.
14. Spagnoli R., Cappelletti L., (1981), Agric. Biol. Chem., 45, 761-763.
15. Calam C. T., (1964), Prog. Ind. Microbiol., 5, 1-53.

16. Davies O. L., (1964), *Biometrics*, 20, 576-591.
17. Simpson I. N., Caten C. E., (1979), *J. Gen. Microbiol.*, 113, 209-217.
18. Simpson I. N., Caten C. E., (1981), *J. Gen. Microbiol.*, 126, 311-319.
19. Sikyta B., Kyslik P., Volesky B., Pavlasova E., Stejskalova E., (1982), in: *Overproduction of Microbial Products*, Eds. Krumphanzl V., Sikyta B., Vanek Z., Academic Press, London, 593-600.
20. Dulaney E. L., Dulaney D. D., (1967), *Trans N. Y. Acad. Sci.*, 29, 782-799
21. Unowsky J., Hoppe D. C., (1978), *J. Antibiot.*, 31, 662-666.
22. Kinoshita S., Nakayama K., (1978), in: *Primary Products of Metabolism. Economic Microbiology*, 2, Academic Press, London, 210-262.
23. Demain A. L., (1978), in: *Primary Products of Metabolism. Economic Microbiology*, Ed. Rose A. H., Academic Press, London, 2, 187-209.
24. Polsinelli M., Albertini A., Cassani G., Ciferri O., (1965), *J. Gen. Microbiol.*, 39, 239-246.
25. Luengo J. M., Revilla G., Villanueva J. R., Martin J. F., (1979), *J. Gen. Microbiol.*, 115, 207-211.
26. Demain A. L., (1973), *Adv. Appl. Microbiol.*, 16, 177-202.
27. Guerola N., Ingraham J. I., Cerda-Olmedo E., (1971), *Nature, New Biology*, London, 230, 122-125.
28. Ball C., (1967), *Genet. Res.*, 10, 173-183.
29. Demain A. L., (1971), *Adv. Biochem. Eng.*, 1, 113-142.
30. Dolezilova L., Spizek J., Vondracek M., Paleckova F., Vanek Z., (1965), *J. Gen. Microbiol.*, 39, 305-310.
31. Woodruff H.B., (1966), *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 16, 22-46.
32. Trenina G. A., Trutneva E. M., (1966), *Antibiotiki*, 770-774.
33. Polya K., Nyiri L., (1966), *Abstr. 9, Int. Congr. Microbiol.*, 172.
34. Saito N., Yamamoto K., (1975), *J. Bacteriol.*, 121, 848-852.
35. Galas E., Kwapisz E., Polak J., Lodzińska J., Celowska M., (1990), *Materiały Sesji Naukowej „Doskonalenie procesów biotechnologicznych”*, 100-108.
36. Fiedurek J., Paszyński A., Ginalska G., Ilczuk Z., (1987), *Zentralbl. Microbiol.*, 142, 407-412.
37. Hodgson D. A., (1982), *J. Gen. Microbiol.*, 128, 2417-2430.
38. Ghosh V., (1982), *Biotech. Bioeng.*, 24, 241-243.
39. Standburg P. F., Whitaker, (1989), in: *Principles of Fermentation Technology*, Pergamon Press, Oxford, 26-73.
40. Sano K., Shio I., (1970), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 16, 373-391.
41. Kubota K., Onda D., Kamijo H., Yoshinaga F., Okamura S., (1973), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 19, 339-352.
42. Martin J. F., Gill J. A., Naharro G., Liras P., Vibanuleva J. R., (1979), in: *Genetics of Industrial Microorganisms*, Eds. Sebek O. K., Laskin A. I., American Soc. Microb., Washington, 205-209.
43. Godfrey O. W., (1973), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 4, 73-79.
44. Chang L. T., Elander R. P., (1979), *Dev. Ind. Microb.*, 20, 367-380.
45. Liu C. M., Mc Daniel L. E., Schafner C. P., (1972), *J. Antibiot.*, 25, 116-121.
46. Gordee E. R., Day L. E., (1972), *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 1, 315-322.
47. Fazakerty G. V., Jackson G. E., (1975), *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 37, 371-375.
48. Sasaki T., Yamasaki M., Maruo B., Yoneda Y., Yamane K., Tamura G., Takatsuku A., (1976), *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, 70, 125-131.
49. Galas E., Kwapisz E., Jakubowski A., (1990), *Materiały XXI Sesji KCh i TŻ PAN, Warszawa*, 69.
50. Yoneda Y., (1980), *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 274-280.
51. Hitotsuyanagi K., Yamane K., Maruo B., (1979), *Agric. Biol. Chem.*, 43, 2343-2351.
52. Martin J. F., (1977), *Adv. biochem. Eng.*, 6, 105-127.
53. Bowman B. J., Alen K. E., Slayman C. W., (1983), *J. Bacteriol.*, 151, 292-296.

54. Mindlin S. Z., Zaitseva Z. M., (1966), *Prikl. Biochim. i Mikrobiol.*, 2 (2), 108-174.
55. Ball C., (1978), in: *Antibiotics and Other Secondary Metabolites Biosynthesis and Production*, Eds. Hutter R., Leisinger T., Nuesch J., Wehrin W., Academic Press, London, 163-176.
56. Kwapisz E., (1978), praca doktorska, Zagadnienia aeracji we wglębnej fermentacji cytrynowej, PŁ, Łódź.
57. Budzyński P., (1992), praca doktorska, Reometr rotacyjny typu „on-line” do pomiaru właściwości reologicznych zawiesin fermentacyjnych, PŁ, Łódź.
58. Hamlyn P. F., Ball C., (1979), in: *Genetics of Industrial Microorganisms*, Eds. Sebek O. K., Laskin A. I., American Soc. Microb., Washington, 185-191.
59. Wiczorek A., Michalski H., (1994), *FEMS Microbiol. Rev.*, 14, 69-74.
60. Udagawa K., Abe S., Kinoshita S., (1962), *J. Ferment. Technol.*, 40, 614-621.
61. Nakao Y., Kikuchi M., Suzuki M., (1972), *Agric. Biol. Chem.*, 36, 490-496.
62. Perlman D., Hall T. C., (1976), Abstracts 172nd, Meeting of the American Chemical Society, 34.
63. Wang D. I. C., Cooney C. L., Demain A. L., Dunnill P., Humphrey A. E., Lilly M. D., (1979), in: *Fermentation and Enzyme Technology*, Wiley Interscience, New York.

Screening methods of industrial strain mutants

Summary

The screening methods used for improvement of industrial strains are presented. Two general categories of methods have been distinguished: random screening and rational screening. Major techniques employed in rational screening are based on the selection of auxotrophic mutants, revertants of non-producers, strains resistant to some factors like toxic analogues of metabolism intermediates, induction and catabolite repression or end-product inhibition, mutants with modified cell wall permeability and microorganisms tolerating some nutrients and precursors of secondary metabolites.

Key words:

screening, selection, microorganisms, strain improvement, industrial strain.

Adres dla korespondencji:

Ewa Kwapisz, Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka,
ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź.