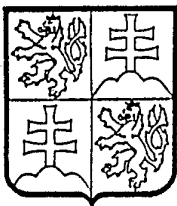


ČESKÁ A SLOVENSKÁ  
FEDERATIVNÍ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD  
PRO VYNÁLEZY

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu

275 913

(21) Číslo přihlášky : 4068-89  
(22) Přihlášeno : 03.07.89  
(30) Prioritní data :  
  
(40) Zveřejněno : 15.04.92  
(47) Uděleno : 20.07.92  
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 16.09.92

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.<sup>5</sup> :

C 12 N 1/20

(73) Majitel patentu : Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, CS

(72) Původce vynálezu : Šilhánková Ludmila doc. ing. CSc., Praha, CS;  
Demnerová Kateřina doc. ing. CSc., Praha, CS;  
Králová Blanka ing. CSc., Praha, CS;  
Ruml Tomáš ing. CSc., Praha, CS;  
Brunnerová Martina ing., Praha, CS

(54) Název vynálezu : Mutantní kmen Streptococcus zooepidemicus Frost a Englebrecht /syn. Streptococcus equi Sand a Jensen/

(57) Anotace :

Mutantní kmen Sstreptococcus zooepidemicus Frost a Englebrecht (syn. Streptococcus equi Sand a Jensen) DBM 1079 nehemolyzující a intenzivně produkující hyaluronovou kyselinu.

Vynález se týká nového mutantního kmenu bakterie *Streptococcus zooepidemicus* Frost a Englebrecht (syn. *Streptococcus equi* Sand a Jensen) vhodného pro výrobu hyaluronové kyseliny fermentačním postupem.

Kyselina hyaluronová, tj. mukózní glykosaminoglykan s lineární, polymerní molekulou o molekulové hmotnosti  $2 \times 10^4$  až  $1,3 \times 10^7$  daltonů, nachází stále širší uplatnění v humánní i veterinární medicíně a v kosmetice. Její přirozené živočišné zdroje, například kohoutí hřebínky, nestačí krýt tuto potřebu, a proto se začala připravovat fermentačním postupem, většinou za použití různých kmenů bakterií náležejících k Lancefieldově skupině A nebo C rodu *Streptococcus*. Silnou tvorbu hyaluronové kyseliny u *Streptococcus pyogenes* v živém bujónu s glukosou zjistili již Pierce W.A.Jr. a White A.G.C. (Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 87, 50-54, 1954 a Faber V. a Rosendal K. (Acta Pathol. Microbiol. Scand. 35, 159-164, 1954). První fermentační produkci této kyseliny pomocí hemolytického streptokoku skupiny A uvádí Holmstrom B. a Řičica J. (Appl. Microbiol. 15, 1409-13, 1967), avšak výtěžek v médiu z telecí infuze s přidávkem 1,1 % glukosy činil pouze 0,4 g hyaluronové kyseliny/l média. Postupy uvedené v řadě patentů a patentových přihlášek používají jako produkční mikroorganismus hemolytické kmeny druhů *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus equi* nebo *Streptococcus zooepidemicus*, přičemž současní taxonomové pokládají posledně jmenovaný druh za identický s druhem *Streptococcus equi*. Patentová přihláška firmy Shiseido Co. Ltd. (Offenlegungsschr. DE 3 517 629 A 1) popisuje použití nehemolytického mutantu *Streptococcus zooepidemicus*. Všechny kmeny a mutanty rodu *Streptococcus* používané při postupech uvedených v patentové i jiné literatuře vyžadují pro dosažení výtěžku 3 až 6 g hyaluronové kyseliny na litr fermentačního média velmi bohaté fermentační médium obsahující vedle 3 až 8 % glukosy ještě 0,5 až 3 % kvasničného autolyzátoru spolu s 2 % hydrolyzátu kaseinu (Nimrod A. a sp. W 086/O4355) nebo s 1 až 3 % peptonu (Shiseido Co. Ltd. J.P. 58-56692, Akasaka a sp. Offenlegungsschrift DE 35 17 629, Hosoya H., E.P. 0244754, Murata H., J.P. 62-289197, Myamori T., E.P. 0266578, Akasaka H., J.P. 61-219394, Karato a sp., J.P. 62-51999) nebo dokonce s 1,5 až 2,5 % obj. telecího séra (Morita Y. a sp., J.P. 61-63294, Offenlegungsschr. DE 35 31 612) a navíc ještě s některými aminokyselinami a/nebo s kukuřičnou máčecí vodou (Murata H., J.P. 62-289197, Takayama K., J.P. 62-32893, Karato a sp., J.P. 62-51999, Miyazaki T., J.P. 62-289198). Kromě toho vyžadují použité kmeny ještě poměrně dlouhou fermentační dobu, tj. 2 až 5 dnů za nepřetržitého upravování  $p^H$  na 7,0. V případě, že se pro produkci hyaluronové kyseliny používá promytých buněk rodu *Streptococcus* (Morita Y. a sp., J.P. 61-15698, Miyamori T. a sp., E.P. Appl. 0266578 A2) je nutno použít tyto velmi bohaté živné půdy pro získání produkčních buněk.

Tyto nedostatky odstraňuje mutantní kmen *Streptococcus zooepidemicus* Frost a Englebrecht - syn. *Streptococcus equi* Sand a Jensen - DBM 1079, který je uložen ve sbírce mikroorganismů katedry biochemie a mikrobiologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze pod číslem DBM 1079.

Tento nehemolytický kmen vyžaduje pro fermentační produkci hyaluronové kyseliny podstatně chudší půdu a dobu fermentace 22

až 26 h, což značně zlevňuje výrobu a zvyšuje kapacitu drahého fermentačního zařízení.

Tento nový kmen podle vynálezu byl získán dvoustupňovou mutagonezí spočívající v působení ultrafialového záření na promyté buňky hemolytického kmenu *Streptococcus zooepidemicus* 4/49 (syn. *Streptococcus equi*) a v následujícím působení nitrosoguanidinu za růstových podmínek na mutant se sníženou hemolytickou aktivitou, vybraný z populace vyrostlé po působení ultrafialového záření. Takto získaný kmen DBM 1079 má zachovány morfologické, asimilační i fermentační vlastnosti původního kmenu, avšak nemá hemolytickou aktivitu a velmi rychle se rozmnožujev živných médiích obsahujících podstatně snížené množství růstových látek, přičemž velmi intenzivně produkuje hyaluronovou kyselinu. Pro produkci této kyseliny potřebuje kmen DBM 1079 zkvasitelný sacharid, nejlépe glukosu nebo její vhodný zdroj jako škrobový sirup, hydrolizát dřeva nebo jiného celulosového materiálu a podobně, zdroj dusíku a růstových látek ve formě 0,1 až 0,30 % hmot./obj.kvasničného autolyzátu a 0,10 až 0,50 % hmot./obj.peptonu, polypeptonu, sojového peptonu nebo hydrolyzátu kaseinu, zdroj fosforu, například fosforečnan draselný a některé minoritní ionty, například hořečnaté a železnaté, popřípadě ještě malé množství glutamátu nebo argininu pro stimulaci produkce. Kvašení probíhá 22 až 26 h za míchání a mírného provzdušňování při 34 až 37°C, přičemž vznikající kyseliny je nutno průběžně neutralizovat přidávaným roztokem hydroxidu sodného nebo draselného. Koncentraci sacharidu je vhodné během fermentace udržovat v rozmezí 0,5 až 3,5 % hmot./obj., za celkového množství sacharidu 3 až 6 g/l fermentační kapaliny. Po proběhnutí kvašení se fermentační kapalina zbaví bakteriálních buněk, nejlépe centrifugací a z čiré kapaliny se izoluje hyaluronová kyselina některým ze známých postupů, například srážením ethanolem s následným přečištěním získané sraženiny.

Vynález je blíže objasněn na konkrétním příkladu fermentační produkce hyaluronové kyseliny, který však v žádném případě neznamená omezení způsobu použití mutantního kmenu DBM 1079 pro přípravu této kyseliny.

#### Příklad

Sterilní fermentační médium obsahující v 1 litru 20 g glukosy, 5,0 g peptonu, 2,5 g kvasničného autolyzátu, 5,0 g  $K_2HPO_4$ , 0,1 g  $Na_2S_2O_3$ , 1,5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,01 g  $FeSO \cdot 7H_2O$  a 1,5 ml Tweenu 80 se zaočkuje 120 ml 10h kultury *Streptococcus zooepidemicus* DBM 1079 v půdě stejného složení jako má fermentační médium, jež byla inkubována za mírného třepání při 37°C. Fermentace probíhá opět při 37°C za mírného míchání a provzdušňování (0,5 l vzduchu/min), přičemž  $p^H$  je udržováno na hodnotě 7,0 pomocí automatické kontroly dávkování přidávaného roztoku NaOH o koncentraci 3 mol/litr. Po 6 h kvašení se přidá 40 ml sterilního 30% hmot./obj. roztoku glukosy a pokračuje se v kvašení. Dalších 40 ml sterilního 30% roztoku glukosy se přidá až po poklesu koncentrace glukosy ve fermentační kapalíně na 1,0 až 1,7 % hmot./obj. Kvašení se potom ukončí při dosažení koncentrace glukosy 0,5 % hmot./obj., čehož se dosáhne během 25 h celkového kvašení. Fermentační kapalina se odstředí ve chlazené odstředivce (30 min při

5 000 g). Supernatant obsahuje 4,7 g hyaluronátu sodného.

#### P A T E N T O V É   N Á R O K Y

Mutantní kmen *Streptococcus zooepidemicus* Frost a Englebrecht (syn. *Streptococcus equi* Sand a Jensen) DBM 1079 nehemolyzující a intenzivně produkující hyaluronovou kyselinu.

Konec dokumentu