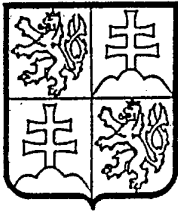


ČESKÁ A SLOVENSKÁ  
FEDERATIVNÍ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD  
PRO VYNÁLEZY

# PATENTOVÝ SPIS 276 099

(21) Číslo přihlášky : 4067-89.X

(22) Přihlášeno : 03 07 89

(30) Prioritní data :

(40) Zveřejněno : 15 01 92

(47) Uděleno : 21 02 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 15 04 92

(13) Druh dokumentu :B6

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

C 12 P 19/26

C 12 P 19/04//

(C 12 P 19/26

C 12 R 1:46)

(73) Majitel patentu : VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ, PRAHA

(72) Původce vynálezu : ŠILHÁNKOVÁ LUDMILA doc. ing. CSc.,  
DEMNEROVÁ KATEŘINA doc. ing. CSc.,  
KRÁLOVÁ BLANKA ing. CSc., RUML TOMÁŠ ing. CSc.,  
BRUNNEROVÁ MARTINA ing., PRAHA

(54) Název vynálezu : Způsob fermentační výroby hyaluronové kyseliny

(57) Anotace :

Způsob výroby spočívá v tom, že mutantní kmen *Streptococcus zooepidemicus* (syn. *Streptococcus equi*) DBM 1079 působí ve fermentačním médiu, které obsahuje kromě 1 až 8 % hmot./obj. zkvasitelného sacharidu, fosfátů, hořečnatých a dalších minoritních iontů 0,10 až 0,30 % hmot./obj. kvasničného autolyzátu a 0,10 až 0,50 % hmot./obj. peptonu, polypeptonu, sojového peptonu nebo hydrolyzátu kaseinu. Kyselina hyaluronová se používá v humánní a veterinární medicíně.

Vynález se týká způsobu výroby hyaluronové kyseliny fermentačním způsobem.

Kyselina hyaluronová, tj. mukózní glykosaminoglykan s lineární polymerní molekulou o molekulové hmotnosti  $2 \times 10^5$  až  $1,3 \times 10^7$  daltonů, nachází stále širší uplatnění v humánní i veterinární medicíně a v kosmetice. Její živočišné zdroje, například kohoutí hřebínky, nepostačují této potřebě, a proto se začala vyrábět fermentačním postupem. Až dosud se k tomuto účelu používaly druhy rodu *Streptococcus* serologické skupiny A a C, tj. *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus equi* a *Streptococcus zooepidemicus*, který je v poslední době pokládán za druh identický s druhem *Streptococcus equi*.

První fermentační postup přípravy hyaluronové kyseliny pomocí hemolytického streptokoku skupiny A popisuje Holmström B. a Řičica J. (*Appl. Microbiol.* 15, 1409 až 1413, 1967), avšak výtěžek v médiu z telecí infuze s přidavkem 1,1 % glukosy činil pouze 0,4 g hyaluronové kyseliny na litr média. 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 % hmot. glukosy ještě 0,5 až 3 % hmot. kvasničného autolyzátu spolu s 2 % hmot. hydrolyzátu kaseinu (Nimrod A. a sp., W 086/04355) nebo s 1 až 3 % hmot. peptonu (Shiseido Co. Ltd., J.P. 58-56692, Offenlegungsschr. 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 1,5 až 2,5 % obj. telecího séra (Morita a sp. J.P. 61-63294, Offenlegungssch. DE 35 31 612) a navíc ještě s přidavkem některých aminokyselin a/nebo cornsteep liquoru (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 pH 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 A 2) je nutno použít tyto velmi nákladné půdy pro získání produkčních buněk.

Tyto nedostatky odstraňuje postup podle vynálezu, který jako produkční mikroorganismus používá mutantní kmen *Streptococcus zooepidemicus* (syn. *Streptococcus equi*) DBM 1079, který je uložen ve sbírce mikroorganismů katedry biochemie a mikrobiologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze pod číslem 1079. Tento nehemolyzující kmen produkuje kyselinu hyaluronovou ve fermentačním prostředí, které obsahuje kromě 1 až 8 % hmot./obj. zkvasitelného sacharidu, fosfátů, hořečnatých a dalších minoritních iontů 0,10 až 0,30 % hmot./obj. kvasničného autolyzátu a 0,10 až 0,50 % hmot./obj. peptonu, polypeptonu, sojového peptonu nebo hydrolyzátu kaseinu. Zkvasitelný sacharid je možno přidávat ve dvou až čtyřech dávkách během fermentačního procesu. Aktuální koncentrace zkvasitelného sacharidu se pohybuje v mezích 0,5 až 3,5 % hmot./obj. Zdroj dusíku a růstových látek je přidáván ve formě kvasničného autolyzátu. Zdrojem fosforu je například fosforečnan draselný. Z minoritních iontů jsou potřebné železnaté, manganaté, případně vápenaté a kobaltnaté ionty. Další stimulace produkce hyaluronové kyseliny může být dosaženo případným přidavkem 0,005 až 0,3 % hmot./obj. argininu nebo glutamátu.

Způsob podle vynálezu probíhá následovně. Fermentační médium je zaočkováno 8 až 16h starou kulturou kmene *Streptococcus zooepidemicus* (syn. *Streptococcus equi*) DBM 1079 v půdě vpředu uvedeného složení. Kvašení probíhá za míchání a mírného provzdušňování při 36 až 37 °C, přičemž vznikající mléčná kyselina a hyaluronová kyselina jsou průběžně neutralizovány přidávaným roztokem hydroxidu draselného nebo sodného. Doba kvašení probíhá 22 až 26 hodin a jeho konec se zjistí buď ze zastavení poklesu koncentrace zkvasitelného sacharidu v médiu nebo ze zastavení stoupání viskozity média, určené například ze zatížení míchadla. Po ukončeném kvašení se médium ihned zbaví buněk, nejlépe odstředěním. Vyhřívání fermentační kapaliny s buňkami před odstředěním (např. 30 min při 85 °C) usnadní odstředění buněk a vede ke zvýšení výtěžnosti hyaluronové kyseliny. Výtěžek hyaluronové kyseliny činí 4 až 5 g/l původního média.

Způsob fermentační výroby hyaluronové kyseliny podle vynálezu je ekonomicky velmi výhodný. Použitý kmen vyžaduje pro fermentaci podstatně chudší živné médium, doba fermentace trvá 22 až 26 hodin při dosažení značně vyšších výtěžků 4 až 5 g/l živného média. Zvýší se zároveň i kapacita automatizovaného fermentačního zařízení, což znamená úspory na energii i nákladech na dalším zařízení.

Vynález je blíže objasněn na konkrétním příkladu produkce hyaluronové kyseliny.

#### Příklad

Sterilní fermentační médium obsahující v 1 litru 20,0 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  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  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, přičemž pH je udržováno na hodnotě 7,0 pomocí automatické kontroly dávkování přidávaného roztoku NaOH o koncentraci 3 mol/litr. Po 6 hod. kvašení se přidá 40 ml sterilního 30% hmot./obj. roztoku glukosy a pokračuje se ve fermentaci. Dalších 40 ml sterilního 30% hmot./obj. roztoku glukosy se přidá až po poklesu koncentrace glukosy ve fermentační kapalině na 1,0 až 1,7 % hmot./obj. Kvašení se ukončí při dosažení koncentrace glukosy 0,3 až 0,5 % hmot./obj., čehož se dosáhne během 24 h celkového kvašení. Fermentační kapalina se odstředí (30 min při 5 000 g). Ze supernatantu se izoluje známým postupem srážením dvojnásobným objemem ethanolu a přečištěním získané sraženiny dialyzou 4,5 g hyaluronátu sodného.

#### P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob fermentační výroby hyaluronové kyseliny, vyznačující se tím, že mutantní kmen *Streptococcus zooepidemicus* (syn. *Streptococcus equi*) DBM 1079 působí ve fermentačním médiu, které obsahuje kromě 1 až 8 % hmot./obj. zkvasitelného sacharidu, fosfátů, hořečnatých a dalších minoritních iontů 0,10 až 0,30 % hmot./obj. kvasničného autolyzátu a 0,10 až 0,50 % hmot./obj. peptonu, polypeptonu, sojového peptonu nebo hydrolyzátu kaseinu.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že zkvasitelný sacharid se přidává ve 2 až 4 dávkách během fermentačního procesu.