

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 295**

51 Int. Cl.:

C12P 19/26 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2012 PCT/KR2012/007955**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13048208**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2012 E 12835852 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2771476**

54 Título: **Streptococcus dysgalactiae id9103 y método para la producción de ácido**

30 Prioridad:

30.09.2011 KR 20110100364

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.04.2018

73 Titular/es:

**ILDONG PHARM CO., LTD. (100.0%)
60 Yangjae-dong Seocho-gu
Seoul 137-733, KR**

72 Inventor/es:

**KANG, DAE-JUNG;
IM, JONG-HYUK;
KIM, TAE-YOON y
KANG, JAE-HOON**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 665 295 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Streptococcus dysgalactiae id9103 y método para la producción de ácido

[Campo técnico]

5 La presente invención se refiere a una cepa del género *Streptococcus* mediante la cual puede producirse ácido hialurónico de alto peso molecular con un alto rendimiento, y a un método de producción de ácido hialurónico utilizando la misma. Más en particular, la presente invención se refiere a una cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 que tiene un número de acceso de KCTC11818BP, y a un método de producción de ácido hialurónico, que comprende la etapa de cultivar la cepa.

[Técnica antecedente]

10 El ácido hialurónico ((AH), Hialuronan, $(C_{14}H_{20}NN_aO_{11})_n$ ($n > 1000$)) es un polímero que existe en todos los organismos vivos, y es un polisacárido, denominado glucosaminoglicano. Este tiene una estructura que está compuesta de ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina alternos, unidos entre sí mediante enlaces glucosídicos alternos β -1,3 y β -1,4. Este es un material soluble en agua y su peso molecular utilizable tiene un amplio intervalo de 1.000 a 10.000.000 Da (daltons). También, tiene una estructura de cadena lineal.

15 El ácido hialurónico con estructura de sal muestra una gran eficacia y un gran efecto, y muestra un fuerte efecto lubricante en un estado de fricción física debido a su alto efecto humectante. También, tiene ventajas preferibles en diversos efectos y propiedades, tales como protección frente a invasión bacteriana, etc. Por tanto, recientemente en el campo del tratamiento médico, se ha realizado el desarrollo usando el ácido hialurónico. Estas ventajas se pueden aplicar a complementos médicos, biomateriales y alimentos, así como pueden desempeñar un papel en suministros médicos o cosméticos. Además, continuamente se han desarrollado nuevos campos basados en ácido hialurónico.

20 Para desarrollar ácido hialurónico, se usa un método de extracción de tejidos biológicos o un método de cultivo de microorganismos. Sin embargo, puesto que un método de extracción de cresta de gallo provoca muchas desventajas, tales como invasión viral, impurezas y reacciones inflamatorias, recientemente se ha usado principalmente un método de producción de cultivo de microorganismos, en el que pueden controlarse el peso molecular y la productividad, y puede obtenerse una alta calidad de las materias primas. Especialmente, en una tendencia reciente, se determina el uso de ácido hialurónico de acuerdo con el intervalo de un peso molecular de ácido hialurónico ajustado y producido mediante cultivo de microorganismos. El ácido hialurónico de peso molecular ultra bajo de 100.000 Da o inferior se usa principalmente para alimentos o cosméticos, y el ácido hialurónico de bajo peso molecular con un peso molecular promedio de 1.000.000 Da se utiliza para desarrollar una materia prima de colirios o sus derivados, y el ácido hialurónico con un peso molecular promedio de 3.000.000 a 4.000.000 Da es muy valioso cuando se utiliza como materia prima para inyección en la articulación de la rodilla.

25 Por supuesto, hay mucho espacio para que se utilice de manera muy diversa ácido hialurónico con un intervalo de pesos moleculares más altos. Se espera que su utilización como un agente terapéutico para la articulación de la rodilla, aunque también como un adyuvante para cirugía oftálmica, pueda aumentarse en gran medida. Además, puesto que en muchas áreas dentro de un organismo se necesita una función de ácido hialurónico de peso molecular ultra alto, el ácido hialurónico de peso molecular ultra alto puede sustituir suficientemente un material de unión de ácido hialurónico convencional obtenido aumentando el peso molecular, la viscosidad o la elasticidad de un ácido hialurónico de peso molecular relativamente bajo.

30 Puede encontrarse que la mayoría de las patentes principales solicitadas en Corea se limitan a la invención de ácido hialurónico de alto peso molecular. La patente registrada coreana N° 10-0250573 (LG) desvela la producción de ácido hialurónico de 3.500.000 Da, y la patente registrada coreana 10-0472007 (Vacctech, kolon) desvela una tecnología de producción de ácido hialurónico con un peso molecular promedio de 5.500.000 Da. La mayoría de los países extranjeros (US4784990, JP2058502 y EP144019) tienen tecnologías de producción de ácido hialurónico de 4.000.000 Da o menos. Especialmente, en un caso de la tecnología de US6090596, puede producirse ácido hialurónico con un alto peso molecular, pero es difícil usar esta tecnología industrialmente en la actualidad debido a su productividad muy baja y a su método de producción, y tampoco está asegurada su eficiencia económica.

35 Se sabe que el ácido hialurónico desarrollado ampliamente en general con un alto peso molecular de 3.000.000~4.000.000 Da es muy insuficiente en vista de eficacia/efecto para ser aplicado en un campo médico que requiere alta viscosidad/elasticidad. Para resolver tal desventaja, se requiere inventar una tecnología para producir ácido hialurónico de un modo económicamente eficiente con un peso molecular ultra alto de 6.000.000 Da o superior. Además, para desarrollar adecuadamente ácido hialurónico de peso molecular ultra alto como un fármaco industrial con alto valor añadido, la tecnología tiene que desarrollarse como una tecnología con competitividad y eficiencia económica a través del método más creativo.

40 En consecuencia, para superar la desventaja, se requiere desarrollar un método de producción de ácido hialurónico de alto peso molecular con alta productividad a través de la composición creativa y económicamente eficiente de un medio de cultivo de microorganismos y aplicación de una tecnología de producción en masa.

[Divulgación]**[Problema técnico]**

5 En consecuencia, los inventores de la presente invención han investigado un método de producir eficientemente ácido hialurónico de alto peso molecular, y entonces lograron *Streptococcus dysgalactiae* ID9103, que es una cepa mutante no hemolítica sin ácido hialurónico liasa. Estableciendo su condición de cultivo óptima, completaron la presente invención.

En consecuencia, un objeto de la presente invención es proporcionar la cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 que tiene un número de acceso de KCTC11818BP.

10 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de producción de ácido hialurónico, que comprende la etapa de cultivar la cepa en un medio que comprende una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno.

15 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método de ajustar un peso molecular de ácido hialurónico, que comprende la etapa de cultivar la cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 que tiene un número de acceso KCTC11818BP en un medio que comprende una fuente de nitrógeno seleccionada entre el grupo que consiste en neopeptona, peptona de caseína e hidrolizado enzimático de caseína, y un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en glutamina, cisteína y lisina.

[Solución técnica]

Para conseguir el objetivo mencionado anteriormente, la presente invención proporciona la cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 que tiene un número de acceso de KCTC11818BP.

20 Para conseguir otro objetivo mencionado anteriormente, la presente invención proporciona un método de producción de ácido hialurónico, que comprende la etapa de cultivar la cepa en un medio que comprende una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno.

25 Para conseguir otro objetivo más mencionado anteriormente, la presente invención proporciona un método de ajustar un peso molecular de ácido hialurónico, que comprende la etapa de cultivar la cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 que tiene un número de acceso de KCTC11818BP en un medio que comprende una fuente de nitrógeno seleccionada entre el grupo que consiste en neopeptona, peptona de caseína e hidrolizado enzimático de caseína, y un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en glutamina, cisteína y lisina.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención puede describirse en detalle.

La presente invención proporciona la cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 que tiene un número de acceso de KCTC11818BP.

30 La cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 de la invención se caracteriza en que es no hemolítica y no expresa hialuronidasa. Además, la cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 de la invención se caracteriza en que produce ácido hialurónico de alto peso molecular con una alta eficiencia de producción.

35 La cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 de la invención es un nuevo microorganismo que se obtiene separando cepas productoras de ácido hialurónico de entre los microorganismos separados de heces de vaca, provocando mutación en las cepas y seleccionando una cepa no hemolítica que no produce ácido hialurónico liasa.

40 La cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 de la invención mencionada anteriormente se identificó como un microorganismo del género *Streptococcus* a través de un experimento de identificación de acuerdo con el manual de Bergey, y después se identificó como *dysgalactiae* del género *Streptococcus* a través de identificación usando un kit Api 20 strep. Por tanto, se denominó *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 y se depositó en la colección coreana de cultivos tipo (www.kctc.re.kr) el 2 de diciembre de 2010 (número de acceso: KCTC-11818BP).

Además, la presente invención proporciona un método de producción de ácido hialurónico, que comprende la etapa de cultivar la cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 de la invención en un medio que comprende una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno.

45 La cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 de la invención puede cultivarse por un método convencional para cultivar un microorganismo del género *Streptococcus*. El medio de cultivo puede comprender la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno, y comprender adicionalmente aminoácido.

50 No hay ninguna limitación específica en el método de cultivo de la invención. Por ejemplo, pueden usarse métodos por lotes, semicontínuos, continuos y de cultivo. En la presente invención, puede usarse preferiblemente un método de cultivo semicontínuo. En el cultivo semicontínuo, un medio a suministrar a un cultivo semicontínuo puede comprender una fuente de nitrógeno, o tanto una fuente de nitrógeno como una fuente de carbono. Más preferiblemente, la fuente de nitrógeno es hidrolizado enzimático de caseína y la fuente de carbono es glucosa.

No hay ninguna limitación en la fuente de carbono, siempre y cuando sea una fuente de carbono conocida, capaz de usarse en el cultivo de microorganismos. Preferiblemente, esta puede seleccionarse entre el grupo que comprende glucosa, fructosa, maltosa, lactosa, galactosa, glicerol y una mezcla de los mismos. Más preferiblemente, esta puede ser glucosa.

5 No hay ninguna limitación en la fuente de nitrógeno, siempre y cuando sea una fuente de nitrógeno conocida, capaz de usarse en el cultivo de microorganismos. Preferiblemente, esta puede seleccionarse entre el grupo que comprende extracto de levadura, peptona de caseína, hidrolizado ácido de caseína, hidrolizado enzimático de caseína, bacto-peptona, casitona, neopeptona y una mezcla de los mismos. Más preferiblemente, esta puede ser una mezcla de extracto de levadura e hidrolizado enzimático de caseína.

10 El hidrolizado enzimático de caseína se obtiene mediante descomposición enzimática de caseína. Por ejemplo, este puede ser triptona, triptona T, triptona X, peptona de biosato BBL, producto de digestión de caseína DIPCO, bacto-casitona, tripticasepeptona BBL, bacto-triptona, triptona Bitec, amina NZ A, amina NZ AS, amina NZ EKC, concentración de amina NZ L, caso NZ, caso NZ M, caso NZ ME, caso NZ plus, caso NZ TT, pepticasa, triptona USP, hidrolizado pancreático de caseína codex, hidrolizado pancreático de caseína, caseína kosher enzimática
15 hidrolizada o triptona V.

El hidrolizado ácido de caseína puede ser hidrolizado ácido de caseína, acidicasa peptona BBL, ácido bacto-casamínico, ácido bacto-casamínico técnico, amicasa, hicasa amino, hiKM, hicasa SF o caseína descompuesta en ácido.

Además, el medio puede comprender adicionalmente aminoácido. No hay ninguna limitación en la clase de aminoácidos que deben añadirse. Preferiblemente, esta puede seleccionarse entre el grupo que comprende glutamina, lisina, cisteína, arginina, metionina, ácido aspártico, glicina y una mezcla de los mismos, y más preferiblemente, puede ser lisina.

Más preferiblemente, la composición del medio puede comprender hidrolizado enzimático de caseína como la fuente de nitrógeno, y lisina como aminoácido. Cuando la cepa de la invención se cultiva en el medio de cultivo que
25 comprende hidrolizado enzimático de caseína junto con lisina, se aumenta la cantidad de ácido hialurónico producido por la cepa, y se produce ácido hialurónico que tiene un peso molecular promedio muy alto.

No hay ninguna limitación específica en las concentraciones de hidrolizado enzimático de caseína y lisina. Preferiblemente, el hidrolizado enzimático de caseína está comprendido a una concentración de 0,5 (p/v) a 3 % (p/v), y la lisina está comprendida a una concentración de 0,015 % (p/v) a 0,6 % (p/v).

30 La cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 de la invención puede usarse para producir ácido hialurónico de peso molecular ultra alto que tiene un peso molecular promedio de 10.000.000 Da o más con un alto rendimiento de 9g/l o más.

Mientras tanto, la presente invención proporciona un método de ajustar un peso molecular de ácido hialurónico, que comprende la etapa de cultivar la cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 que tiene un número de acceso de KTC
35 11818 BP en un medio que comprende una fuente de nitrógeno seleccionada entre el grupo que consiste en neopeptona, peptona de caseína e hidrolizado enzimático de caseína, y un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en glutamina, cisteína y lisina, en el que el peso molecular de ácido hialurónico producido en la etapa de cultivo se ajusta a entre 6.000.000 Da y 11.000.000 Da.

El peso molecular indica un peso molecular promedio de ácido hialurónico, y el ajuste indica que las clases de fuente de nitrógeno y aminoácido se cambian de manera que produzcan ácido hialurónico que tenga un intervalo específico de pesos moleculares. El intervalo de peso molecular de ácido hialurónico no está específicamente limitado. Preferiblemente, el peso molecular puede variar de 6.000.000 Da a 7.000.000 Da, de 7.000.000 Da a 8.000.000 Da,
40 de 8.000.000 Da a 9.000.000 Da o de 9.000.000 Da a 11.000.000 Da.

Además, de acuerdo con el método de producción de la invención, mediante el uso de la cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 de la invención, según se requiera, es posible producir ácido hialurónico de peso molecular ultra alto que tenga diversos pesos moleculares promedio de 6.000.000 Da o más con alto rendimiento.

Específicamente, cuando la cepa de la invención se cultiva en un medio que comprende neopeptona y glutamina, o un medio que comprende peptona de caseína y cisteína, es posible producir ácido hialurónico que tiene un peso molecular promedio de 6.000.000 Da a 7.000.000 Da.

50 Cuando la cepa de la invención se cultiva en un medio que comprende hidrolizado enzimático de caseína y glutamina, o un medio que comprende peptona de caseína y lisina, es posible producir ácido hialurónico que tiene un peso molecular promedio de 7.000.000 Da a 8.000.000 Da.

Cuando la cepa de la invención se cultiva en un medio que comprende hidrolizado enzimático de caseína y lisina, es posible producir ácido hialurónico que tiene un peso molecular promedio de 8.000.000 Da a 9.000.000 Da.

55 Cuando la cepa de la invención se cultiva en un medio que comprende hidrolizado enzimático de caseína y lisina a través de un método de suministrar el hidrolizado enzimático de caseína de una manera semicontinua, es posible producir ácido hialurónico que tiene un peso molecular promedio de 9.000.000 Da a 11.000.000 Da.

El peso molecular promedio descrito en esta invención indica un peso molecular promedio en peso.

Los efectos de la invención se muestran a través de un Ejemplo de la presente invención.

En un Ejemplo de la presente invención, aproximadamente 500 muestras recogidas de 10 establos de todo el país se frotaron en un medio sólido de infusión de cerebro y corazón al 3,7 %, y se separaron las colonias que produjeron una sustancia viscosa. Después, se seleccionó un coco con una estructura de cadena a través de un microscopio y se seleccionó una cepa gram-positiva a través de un método de tinción de gram. La cepa seleccionada se cultivó y después, a través de un método de carbazol y un análisis de turbidez, se separó una cepa que produjo ácido hialurónico. Provocando mutación en la cepa separada, se separó una cepa no hemolítica que no expresa enzima de hialuronidasa. Como resultado, se determinó que la cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 de la invención no expresa enzima de hialuronidasa, no muestra hemoliticidad y es excelente en la capacidad de producción de ácido hialurónico. Después, a través de identificación, se identificó como *dysgalactiae* del género *Streptococcus*, y se depositó con un número de acceso de KCTC11818BP en la colección coreana de cultivos tipo (KCTC) el 2 de diciembre de 2010.

En un Ejemplo en la presente invención, se cultivaron un *Streptococcus dysgalactiae* convencional y la cepa de la invención en las mismas condiciones para medir la tasa de producción y la viscosidad de ácido hialurónico. Como resultado, se descubrió que la cepa de la invención muestra una capacidad de producción de ácido hialurónico mayor que la cepa convencional en un 20 % o más, y muestra una viscosidad significativamente superior que la cepa convencional. Por tanto, se determinó que la cepa de la invención es una cepa que puede producir eficazmente ácido hialurónico de alto peso molecular.

En otro Ejemplo de la presente invención, se estableció una condición de cultivo que puede incrementar la capacidad de producción de ácido hialurónico de la cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 de la invención. Midiendo la capacidad de producción de ácido hialurónico y la viscosidad de la solución de cultivo según las concentraciones de extracto de levadura, tipos y concentraciones de aminoácidos, y tipos y concentraciones de una fuente de nitrógeno, se seleccionaron composiciones de medio que mostraban una alta capacidad de producción y que podían producir ácido hialurónico de alto peso molecular. A través de un ensayo de cultivo usando una combinación de estas condiciones, se estableció una condición de cultivo óptima. Específicamente, se descubrió que cuando el extracto de levadura está comprendido en la composición a una concentración de 0,75 % o más, se aumenta la producción de ácido hialurónico y se aumenta el peso molecular promedio de ácido hialurónico. Se descubrió que cuando se usa lisina, cisteína, arginina o metionina, se produce ácido hialurónico de alto peso molecular y también se descubrió que cuando se usa hidrolizado ácido de caseína, hidrolizado enzimático de caseína o neopeptina como fuente de nitrógeno, se produce ácido hialurónico de alto peso molecular.

En otro Ejemplo en la presente invención, se descubrió que cuando se cultiva la cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 mediante la combinación de diversas condiciones de cultivo según se han obtenido anteriormente, pueden producirse diversos ácidos hialurónicos de alto peso molecular que tienen un peso molecular de 6.000.000, 7.000.000 u 8.000.000 Da. En consecuencia, se descubrió que puede producirse ácido hialurónico de diversos pesos moleculares requeridos con una alta eficiencia a través de la cepa de la invención y el método de cultivo de la invención.

También, en un Ejemplo en la presente invención, cuando la cepa se cultiva en una composición de medio que comprende hidrolizado enzimático de caseína y lisina, se aumenta la cantidad de ácido hialurónico producido y se aumenta significativamente el peso molecular promedio del ácido hialurónico producido. Por tanto, se ensayaron las concentraciones correctas. Como resultado, se descubrió que cuando el hidrolizado enzimático de caseína está comprendido a una concentración de 0,5 (p/v) a 3 % (p/v), y la lisina está comprendida a una concentración de 0,015 % (p/v) a 0,6 % (p/v), puede producirse con alta eficiencia ácido hialurónico con un peso molecular promedio de 8.000.000 Da o más.

En otro Ejemplo en la presente invención, se descubrió que cuando el hidrolizado enzimático de caseína y una composición de medio básico (glucosa) se suministran de una manera semicontinua en un método de cultivo semicontinuo, se produce ácido hialurónico de peso molecular ultra alto que tiene un peso molecular promedio de 10.000.000 Da o más con una eficiencia muy alta de 9,0 g/l o más.

[Efectos ventajosos]

La presente invención proporciona una cepa de *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 que tiene un número de acceso de KCTC11818BP mediante la cual puede producirse ácido hialurónico de alto peso molecular con un alto rendimiento, y un método de producción de ácido hialurónico usando la misma. La cepa de la invención puede producir con un alto rendimiento ácido hialurónico de peso molecular ultra alto con un alto valor añadido. En el método de la invención, de acuerdo con composiciones de un medio, es posible producir diversos ácidos hialurónicos de peso molecular ultra alto y producir ácido hialurónico de peso molecular ultra alto que tiene un peso molecular promedio de 10.000.000 Da o más hasta el máximo.

[Descripción de los dibujos]

- La FIG. 1 muestra el resultado de identificación de la cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 de la invención, identificada mediante un kit Api.
- 5 La FIG. 2 es un gráfico que muestra la cantidad de ácido hialurónico producido, la viscosidad de una solución de cultivo y la cantidad de células microbianas, de acuerdo con las clases y concentraciones de aminoácido añadidas.
- La FIG. 3 es un gráfico que muestra la cantidad de ácido hialurónico, la viscosidad de una solución de cultivo y la cantidad de células microbianas, de acuerdo con las clases y concentraciones de peptonas añadidas.
- 10 La FIG. 4 es un gráfico que muestra la cantidad de ácido hialurónico producido, la viscosidad de una solución de cultivo y la cantidad de células microbianas con un lapso de tiempo de producción cuando la cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 de la invención se cultiva en un baño de fermentación 1t, en un medio de cultivo que comprende hidrolizado enzimático de caseína y lisina.

[Modo de la invención]

- 15 En lo sucesivo en el presente documento, se describirá una realización preferida de la presente invención con referencia a las figuras adjuntas.

En la siguiente descripción y dibujos, se utilizan los mismos números de referencia para designar componentes iguales o similares y por tanto se omitirá la repetición de la descripción en los componentes iguales o similares.

<Ejemplo 1>

- 20 **Selección de *Streptococcus dysgalactiae* ID9103**

<1-1> obtención de la cepa del género *Streptococcus* que produce ácido hialurónico

- El género *Streptococcus* que produce ácido hialurónico (AH) se cultiva bien en un medio de infusión de cerebro y corazón (cerebros de ternera, infusión 0,77 %, corazones de res, infusión 0,98 %, proteosa peptona 1 %, dextrosa 0,2 %, NaCl 0,5 %, fosfato disódico 0,25 %; BD, US), y en una sola separación de colonias, puede producir ácido hialurónico, formando de este modo colonias más regulares y viscosas que las colonias generales.
- 25

Aproximadamente 500 muestras recogidas de 10 establos de todo el país se diluyeron de manera que pueden cultivarse aproximadamente 200 colonias por medio sólido y se frotaron en un medio sólido de infusión de cerebro y corazón al 3,7 %. Después, a simple vista, se seleccionaron las colonias que se descubrió que producían una sustancia viscosa.

- 30 Para observar morfológicamente las cepas separadas, estas se frotaron en un medio sólido de infusión de cerebro y corazón para separar las colonias y se cultivaron en un medio de cultivo a 37 °C. Cuando se formaron las colonias, se dejó caer una gota de agua destilada esterilizada en un portaobjetos. Después, se puso una colonia en la punta de un palillo esterilizado y se disolvió en agua destilada. Se cubrió con un cubreobjetos, y un coco con estructura de cadena, como el género *Streptococcus*, se seleccionó mediante la observación ampliada de células microbianas a través de un microscopio (x400).
- 35

- Para seleccionar el género *Streptococcus* gram-positivo, se preparó una muestra en un portaobjetos a través de un método de tinción de gram en el método descrito anteriormente y se calentó ligeramente en una lámpara para adherir las bacterias sobre el portaobjetos. Aproximadamente 1 minuto más tarde, después de la tinción con el colorante, el colorante se lavó con agua ligeramente corriente. Cuando el agua se secó hasta cierto punto, se dejó caer una gota de aceite mineral. La muestra se cubrió con un cubreobjetos y se observó mediante un microscopio. Aquí, las bacterias gram-positivas teñidas son de color violeta. A través de este método, se seleccionaron las cepas candidatas adecuadas.
- 40

- Para determinar si una sustancia viscosa producida por cada cepa es AH, se confirmó la producción de AH. Para confirmar la producción de AH, se usaron una reacción de carbazol y una reacción de cetiltrimetilbromuro de amonio (CTAB). La reacción de carbazol es un método de medición de la cantidad de ácido glucurónico producida por la descomposición de AH mediante ácido sulfúrico. Después de confirmarse la producción de AH mediante la reacción de carbazol, se realizó la reacción de CTAB para confirmar la producción de AH. El CTAB destruye una membrana mucosa y la hace opaca. El AH es una sustancia viscosa y por tanto forma un complejo insoluble y se vuelve opaca al ser destruida por CTAB. La reacción de carbazol tiene la desventaja de que, dado que se mide el ácido glucurónico producido por otros azúcares, el AH puede medirse en una mayor cantidad en un estado de solución de cultivo que en una cantidad real. Puesto que el CTAB reacciona únicamente con el AH, es posible confirmar de un modo sencillo la producción de AH en poco tiempo. A través de la reacción de carbazol, se seleccionaron las cepa que producen polisacárido, incluyendo AH, y de entre las cepas, a través de la reacción de CTAB, se seleccionó una cepa que produce AH.
- 45
- 50

La reacción de carbazol es un método en el que puede cuantificarse el ácido urónico. El ácido glucurónico, uno de los materiales que constituyen el ácido hialurónico, se colorea de púrpura por la reacción, y por tanto puede cuantificarse. En la reacción de carbazol, se disolvió 1 ml de una muestra en 5 ml de decahidrato de tetraborato sódico 0,025 M (en H₂SO₄), se mezclaron lo suficiente y se hirvieron en agua durante 10 minutos. Después de enfriarse en hielo, se añadió y se mezcló con 200 ul de carbazol al 0,1 % (en EtOH) y se hirvió en agua durante 10 minutos. A 525 nm, se midió la absorbencia.

En la reacción de CTAB, una solución de cultivo diluida a 1/10 se diluyó de nuevo a la mitad de la concentración con una solución de SDS al 0,03 %. Después, se mezclaron 200 ul de la solución resultante con 200 ul de tampón de ácido acético (acetato sódico 1,55 %, ácido acético 0,063 %, NaCl 0,88 %) y se hicieron reaccionar a 37 °C durante 30 minutos. Se le añadieron 800 ul de una solución de CTAB. A 600 nm, se midió la absorbencia.

<1-2> obtención de cepa mutante no hemolítica sin actividad de hialuronidasa

La cepa productora de ácido hialurónico seleccionada en el Ejemplo <1-1> se cultivó con agitación en 50 ml de medio líquido de infusión de cerebro y corazón al 3,7 % durante 24 horas a 37 °C. Una solución de cultivo OD (600) de 0,3 se trató con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), seguido de agitación a 37 °C durante 1 hora para determinar la condición a una tasa letal del 95 %. La solución de cultivo tratada con 10 mg/ml de NTG se centrifugó a una velocidad de rotación de 4000 rpm durante 10 minutos, y las células microbianas se recogieron y se lavaron tres veces con tampón de tris-maleato 50 mM (pH 8,0). Las esporas en las que se indujo la mutación se diluyeron con una solución salina esterilizada a una concentración de 10²~10⁴/ml, y se frotaron en un medio sólido de infusión de cerebro y corazón que incluía un 5 % de sangre de oveja y se cultivaron a 37 °C. Después, se seleccionaron colonias no hemolíticas sin ninguna zona transparente hecha por la destrucción de eritrocitos. Sin embargo, puesto que puede aparecer de nuevo hemoliticidad, se realizó repetidamente la mutación de NTG para tales colonias no hemolíticas. Después, se seleccionaron las colonias que no muestran hemoliticidad en el subcultivo.

De entre las cepas no hemolíticas obtenidas, se seleccionaron colonias que no expresan enzima de hialuronidasa mediante la reacción de CTAB descrita en el Ejemplo 1-1. Las cepas no hemolíticas obtenidas se cultivaron durante un día en un medio sólido de infusión de cerebro y corazón añadido con ácido hialurónico al 0,1 % y se adaptó CTAB al 10 % a la capa superior. De entre las colonias sin actividad de hialuronidasa, se seleccionó *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 que no tiene ninguna zona transparente a su alrededor.

<1-3> identificación de cepa seleccionada

Para identificar la cepa como género *Streptococcus* en base a características bioquímicas en el manual de Bergey, en un experimento de identificación, se añadió un medio básico, que incluye extracto de levadura y peptona, con el azúcar o aminoácido requerido para determinar las características bioquímicas, y se cambió el viraje cromático. Las fuentes añadidas al medio comprenden inulina, lactosa, manitol, rafinosa, ribosa, salicina, sorbitol, trehalosa, arginina, esculina e hipurato. Aquí, se le añadió púrpura de bromocresol (BCP) y se observó el cambio de color entre la cepa y un control no inoculado. El BCP se vuelve violeta a pH neutro, amarillo a pH ácido y rojo a pH básico. Antes de que se inocule con células microbianas, el medio es neutro y de color violeta.

Como resultado, la cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 de la invención mostró una característica muy similar a la *dysgalactiae* del género *Streptococcus* basada en el manual de Bergey. Este resultado se indica en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Características bioquímicas									
	Inulina	Lactosa	Manitol	Rafinosa	Ribosa	Trehalosa	Arginina	Esculina	Hipurato
Grupo de control	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Grupo de ensayo	-	+	-	-	+	+	+	-	-

La cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 seleccionada en el Ejemplo <1-2> se identificó usando un kit Api. Usando un kit de estreptococos Api 20 (Biomérieux, Francia) para la identificación de *Streptococcus*, se realizó la identificación siguiendo el manual del fabricante. En un medio sólido, la cepa se disolvió lo suficiente en 2 ml de medio de suspensión usando una torunda de algodón para preparar el líquido de inoculación con una turbidez de 4 McFarland. El estreptococo comprende un total de 20 cúpulas, incluyendo VP, HIP, ESC, PYRA, αGAL, βGUR, βGAL, PAL, LAP, ADH, RIB, ARA, MAN, SOR, LAC, TRE, RAF, AMD, y GLYG en orden, y provocan diferentes reacciones, respectivamente. Para cada uno de VP a LAP, el líquido de inoculación se cargó en una cantidad de 100 ul, y para los demás, el líquido de inoculación en una cantidad de 500 ul mezclados con 2 ml de medio GP se cargó en una cantidad de 100 ul. Se añadieron ADH y GLYG con aceite mineral. Después de cultivar durante 4

horas, se añadió VP con una gota de cada uno de VP1 y VP2, se añadió HIP con dos gotas de reactivo de NIN y se añadieron PYRA a LAP con una gota de cada uno de los reactivos ZYM A y ZYM B. Después de 10 minutos, se midieron los resultados, y después de 24 horas, se leyeron de nuevo los resultados en las otras cúpulas.

5 Como resultado, como se muestra en la FIG. 1, se identificó que el *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 de la invención es *dysgalactiae* del género *Streptococcus*.

El *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 se depositó con un número de acceso de KCTC11818BP en la colección coreana de cultivos tipo (KCTC) el 2 de diciembre de 2010.

<Ejemplo 2>

10 **Ensayo de condiciones básicas de cultivo en la producción de ácido hialurónico de alto peso molecular y ensayo de comparación de cantidad de producción**

<2-1> ensayo de condiciones básicas de cultivo

15 Se descongelaron rápidamente 4 ml de solución de cultivo de cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 almacenada en un frigorífico a -72 °C, se frotaron en un medio sólido de infusión de cerebro y corazón al 5,2 % y se cultivaron a 37 °C durante 24 horas. La colonia cultivada se cortó con un área de 1 cm² y se inoculó en 40 ml de medio líquido esterilizado de caldo Todd-Hewitt al 3 % (corazón, infusión 0,31 %, neopeptona 2 %, dextrosa 0,2 %, NaCl 0,2 %, fosfato disódico 0,04 %, carbonato sódico 0,25 %; BD, US).

20 Se usaron 40 ml del cultivo agitado líquido a 37 °C a 120 rpm como una solución de cultivo de siembra primaria. En una fase logarítmica de crecimiento tras cultivar durante 6 horas, el líquido de siembra primario se inoculó asépticamente a tres medios líquidos esterilizados de caldo Todd-Hewitt al 3 % (40 ml, pH 7,8). En las condiciones de cultivo de 37 °C y 120 rpm, después del cultivo aséptico durante 20 horas o más, el medio cultivado se usó como una solución de cultivo de siembra secundaria. Aquí, la solución de cultivo de siembra secundaria tiene que mantenerse a un pH de 6,4 ±0,2, y tener OD (600) de 0,35±0,05. Se inocularon 120 ml de la solución de cultivo de siembra secundaria a un medio de cultivo principal, seguido de cultivo durante 40 horas o más. De acuerdo con una velocidad de rotación de un impulsor de baño de fermentación, una temperatura de cultivo y una composición del medio, se observa la diferencia de productividad entre ácidos hialurónicos. Después, se determinó la condición para aumentar la productividad de ácido hialurónico. Este proceso de cultivo se realizó de la misma manera en todos los Ejemplos.

25 El medio de cultivo principal que determina el ensayo para producir óptimamente ácido hialurónico se realizó en un baño de fermentación de 5 l en una condición de solución de cultivo de 3,5 l. La composición del medio comprendió glucosa 6 %(p/v), extracto de levadura 0,5 %(p/v), peptona de caseína 2 %(p/v), glutamina 0,06 %(p/v), gluconato sódico 0,1 %(p/v), ácido oxálico 0,02 %(p/v), sulfato de magnesio 0,15 %(p/v), fosfato potásico dibásico 0,25 %(p/v), cloruro sódico 0,5 %(p/v), acetato sódico 0,5 %(p/v), cloruro férrico 0,007 %(p/v) y molibdato de amonio 0,05 %(p/v). El ensayo se realizó básicamente en la condición de pH 7,0 y 34 °C.

30 En la presente invención, la concentración de ácido hialurónico en la solución de cultivo se confirmó tanto por un método de carbazol (T. Bitter, Anal. Biochem., 1962, 4, 330-334) como un análisis de turbidez (S. Jung-Min, Carbohydr. Polym., 2009, 78, 633-634).

35 El análisis de viscosidad se realizó usando LVDV-1 (Brookfield, US), en el que la viscosidad (cP) se midió analizando la muestra de ensayo en la condición de husillo N.º S31, rpm 3,0 y la temperatura de muestra de 25 °C .

40 La cantidad de células microbianas se midió transfiriendo 200 ul de la solución de cultivo diluida a una concentración adecuada (1/10 de la solución de cultivo) a una microplaca de 96 pocillos y midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm mediante un lector de microplacas multimodal (BioTek, US).

45 La velocidad de rotación del propulsor del baño de fermentación es importante puesto que el impulsor desempeña una función de ayuda en el crecimiento de células microbianas permitiendo que el oxígeno y los nutrientes se mezclen de un modo uniforme con el medio. En la tabla 2 se indica el resultado del cultivo de ID9103 cuando se ajusta la velocidad de rotación para que sea de 100 a 500 rpm.

A cada velocidad de rotación del impulsor, la cantidad de ácido hialurónico producido y la cantidad de células microbianas fueron similares entre sí, mientras que se aumentó la viscosidad. Por tanto, se encontró que una baja velocidad de rotación del impulsor es útil para aumentar el peso molecular. En consecuencia, en los ensayos de los siguientes Ejemplos, la velocidad de rotación del impulsor del baño de fermentación se fijó como 100 rpm.

50

[Tabla 2]

Concentración de ácido hialurónico de acuerdo con la velocidad de rotación del impulsor			
velocidad de rotación del impulsor (rpm)	Conc. de ácido hialurónico (g/l)	cantidad de células microbianas (A600)	viscosidad (cP)
100	7,468	2,540	2860
300	7,452	2,765	1210
500	7,431	2,687	870

<2-2> Ensayo de comparación sobre la cantidad de ácido hialurónico producido

5 Una cepa de *Streptococcus dysgalactiae* convencional y la cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 de la invención se cultivaron en las mismas condiciones, y se compararon las cantidades de ácido hialurónico producido.

La composición del medio y las condiciones de cultivo fueron las mismas que se han descrito en el Ejemplo <2-1> y la velocidad el impulsor se estableció a 100 rpm.

10 Como resultado, como se indica en la tabla 3, se descubrió que la cepa de la invención muestra una mayor cantidad de producción de ácido hialurónico que la cepa convencional en un 20 % o más en las mismas condiciones. Específicamente, se descubrió que la cepa de la invención muestra una viscosidad significativamente mayor que la cepa convencional. Por tanto, se determinó que la cepa de la invención es una cepa que produce eficientemente ácido hialurónico de alto peso molecular.

[Tabla 3]

Concentración de ácido hialurónico comparada con un Streptococcus convencional			
Cepa	Conc. de ácido hialurónico (g/l)	cantidad de células microbianas (A600)	viscosidad (cP)
ID9102	6,039	3,710	1680
ID9103	7,311	2,881	2580

15 <Ejemplo 3>

Productividad de ácido hialurónico de alto peso molecular de acuerdo con el ajuste de la concentración de extracto de levadura

20 Basándose en las condiciones de cultivo y la composición del medio determinadas en el <Ejemplo 2>, el cultivo se realizó variando la concentración de extracto de levadura. Se sabe que la fuente de nitrógeno desempeña una función importante en el metabolismo de microorganismos y tiene un efecto sobre la producción de ácido hialurónico. En consecuencia, se determinó que el ajuste de la concentración del extracto de levadura como la fuente de nitrógeno puede contribuir a la productividad de ácido hialurónico.

25 Como resultado, como se indica en la tabla 4, se aumentó la viscosidad a un 2 % (p/v) de extracto de levadura, en comparación con el 0,5 % (p/v) de extracto de levadura. En consecuencia, se determinó que el aumento de la concentración de extracto de levadura es adecuado para producir ácido hialurónico de alto peso molecular. En los ensayos de los siguientes Ejemplos, la concentración del extracto de levadura se aumentó hasta el 2 % (p/v).

[Tabla 4]

Concentración de ácido hialurónico de acuerdo con la concentración de extracto de levadura			
Conc. de extracto de levadura (%(p/v))	Conc. de ácido hialurónico (g/l)	cantidad de células microbianas (A600)	viscosidad (cP)
0,5	7,490	2,365	2620
2	7,896	2,565	3370
3,5	7,782	2,820	3050

<Ejemplo 4>**Efecto de aminoácido sobre la producción de ácido hialurónico**

5 Basándose en las condiciones de cultivo y la composición del medio determinadas en los Ejemplos previos, se determinó como los diversos aminoácidos tienen un efecto sobre la producción de ácido hialurónico de alto peso molecular. Los aminoácidos usados en este Ejemplo se indican en la Tabla 5. Se reemplazó glutamina convencional por los aminoácidos de la tabla 5.

10 Como resultado, como se indica en la tabla 5, los grupos que usan lisina, cisteína o arginina produjeron ácido hialurónico en una cantidad de 8 g/l o más, y los otros grupos que comprenden lisina, cisteína, arginina o metionina mostraron una viscosidad mayor que la de un grupo de control. Especialmente, un grupo que comprende lisina mostró una viscosidad muy superior (4.230 cP) a la del grupo de control.

[Tabla 5]

producción de ácido hialurónico según aminoácidos			
aminoácido	Conc. de ácido hialurónico (g/l)	cantidad de células microbianas (A600)	viscosidad (cP)
glutamina	7,501	2,472	3170
lisina	8,111	2,511	4230
cisteína	8,034	2,503	4160
arginina	8,211	2,626	3890
metionina	7,992	2,803	3940
ácido aspártico	7,861	2,721	2790
glicina	7,792	2,398	2980

<Ejemplo 5>**Efecto de la concentración de aminoácido sobre la producción de ácido hialurónico**

15 Para determinar la concentración en el medio correcta en lisina, cisteína, arginina y metionina que muestra alta viscosidad en el <Ejemplo 4>, cada aminoácido se añadió a diversas concentraciones, seguido de cultivo. Después, se midieron la concentración de ácido hialurónico, la cantidad de células microbianas, la viscosidad de la solución de cultivo y similares.

20 Como resultado, como se indica en la tabla 6 y se muestra en la FIG. 2, 4 clases de aminoácidos a una concentración de 0,03 %(p/v) mostraron mayor viscosidad que a otras concentraciones. La lisina y la cisteína mostraron niveles de viscosidad superiores (4230 cP y 4160 cP, respectivamente) que a otras concentraciones. La arginina y la metionina mostraron niveles de viscosidad superiores (3890 y 3940 cP, respectivamente) que las condiciones convencionales, aunque los niveles no alcanzaron 4000 cP. En estas condiciones de concentración, se produjo ácido hialurónico en una cantidad de aproximadamente 8 g/l, que fue superior que a otras concentraciones.

25 En los ensayos de los siguientes Ejemplos, la concentración de aminoácido se estableció fijamente como 0,03 %(p/v).

[Tabla 6]

producción de ácido hialurónico según la concentración de aminoácido				
aminoácido/Conc.	Conc. de ácido hialurónico (g/l)	cantidad de células microbianas (A600)	viscosidad (cP)	
glutamina	0,06 %	7,542	2,472	3170
lisina	0,015 %	6,521	2,345	3740
	0,03 %	8,070	2,511	4230
	0,06 %	5,140	2,667	2200

(continuación)

producción de ácido hialurónico según la concentración de aminoácido				
aminoácido/Conc.		Conc. de ácido hialurónico (g/l)	cantidad de células microbianas (A600)	viscosidad (cP)
cisteína	0,015 %	6,153	2,578	3690
	0,03 %	7,956	2,503	4160
	0,06 %	5,315	2,541	2310
arginina	0,015 %	7,032	2,410	3360
	0,03 %	8,120	2,626	3890
	0,06 %	4,952	2,578	2060
metionina	0,015 %	7,254	2,521	3560
	0,03 %	7,934	2,803	3940
	0,06 %	5,060	2,784	2120

<Ejemplo 6>**Efecto de peptonas (como fuente del medio) sobre la producción de ácido hialurónico**

- 5 Basándose en las condiciones de cultivo y en la composición del medio determinadas en el <Ejemplo 3>, se determinó si puede producirse ácido hialurónico de alto peso molecular reemplazando la peptona de caseína convencional usada como la fuente de nitrógeno por otras peptonas como fuente del medio. Las peptonas usadas en este Ejemplo se indican en la tabla 7, y la concentración fue 1 % (p/v).
- 10 Como resultado, como se indica en la 7, el hidrolizado ácido de caseína, hidrolizado enzimático de caseína y la neopeptona mostraron mayores niveles de viscosidad que la peptona de caseína. Especialmente, el hidrolizado enzimático de caseína mostró un nivel de viscosidad de 4590 cP, y se espera positivamente que produzca ácido hialurónico de alto peso molecular.

[Tabla 7]

producción de ácido hialurónico según las peptonas como fuente del medio			
peptonas como una fuente del medio	Conc. de ácido hialurónico (g/l)	cantidad de células microbianas (A600)	viscosidad (cP)
peptona de caseína	7,506	2,520	3350
hidrolizado ácido de caseína	7,481	2,774	3610
hidrolizado enzimático de caseína	8,210	2,564	4590
bacto peptona	7,614	2,865	3050
casitona	7,210	3,048	3140
neopeptona	7,513	2,716	3420

15 <Ejemplo 7>**Efecto de la concentración de peptonas (como fuente del medio) sobre la producción de ácido hialurónico**

Para determinar una concentración en el medio correcta de hidrolizado ácido de caseína, hidrolizado enzimático de caseína y neopeptona que mostraron alta viscosidad en el <Ejemplo 6>, cada fuente de nitrógeno se añadió a diversas concentraciones, seguido de cultivo. Después, se midieron la concentración de ácido hialurónico, la

cantidad de células microbianas, la viscosidad de la solución de cultivo y similares.

Como resultado, como se indica en la tabla 8 y se muestra en la FIG. 3, el hidrolizado enzimático de caseína mostró la mayor viscosidad al 1 % (p/v), y el hidrolizado ácido de caseína y la neopeptona mostraron la mayor viscosidad al 1,5 % (p/v). El hidrolizado enzimático de caseína y la neopeptona mostraron altas cantidades de producción de 8,2 g/l y 8,0 g/l, respectivamente, y altos niveles de viscosidad de 4590 cP y 4140 cP, respectivamente. El hidrolizado ácido de caseína mostró una alta cantidad de producción de 8,1 g/l, pero mostró únicamente un nivel de viscosidad de 3980 cP (menos de 4000 cP). En los ensayos de los siguientes Ejemplos, basados en este resultado, la concentración de hidrolizado enzimático de caseína se estableció fijamente como 1 % (p/v), y la concentración de hidrolizado ácido de caseína y neopeptona se estableció fijamente como 1,5 % (p/v).

[Tabla 8]

producción de ácido hialurónico según las peptonas como fuente del medio				
peptonas como fuente del medio/concentración		Conc. de ácido hialurónico (g/l)	cantidad de células microbianas (A600)	viscosidad (cP)
peptona de caseína	2 %	7,506	2,520	3350
hidrolizado enzimático de caseína	1 %	7,523	2,463	4210
	2 %	8,210	2,564	4590
	3 %	7,103	2,573	4010
hidrolizado ácido de caseína	1 %	7,435	2,626	3580
	2 %	7,481	2,774	3610
	3 %	8,102	2,874	3980
neopeptona	1 %	7,438	2,346	3310
	2 %	7,513	2,716	3420
	3 %	7,982	2,557	4140

<Ejemplo 8>

comparación de productividad de ácido hialurónico según la combinación de peptonas con aminoácido

Usando la combinación de aminoácido determinada en el <Ejemplo 4> y el <Ejemplo 5>, con las peptonas determinadas en el <Ejemplo 6> y el <Ejemplo 7>, se determinó el efecto sobre la producción de ácido hialurónico. En la composición del medio que comprende la combinación de peptonas con aminoácido según se indica en la tabla 9, se cultivó el *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 de la invención para producir ácido hialurónico.

Como resultado, cada combinación de fuentes del medio de peptona con aminoácido mostró una concentración de ácido hialurónico de aproximadamente 8 g/l. Mientras tanto, en la viscosidad, la combinación con hidrolizado enzimático de caseína mostró un nivel mayor. Especialmente, la combinación de hidrolizado enzimático de caseína-lisina mostró una alta concentración de ácido hialurónico de 8,3 g/l, y un mayor nivel de viscosidad (5320 cP) que el hidrolizado enzimático de caseína en el <Ejemplo 7> (4590 cP) en 730 cP. Por tanto, se determinó que puede producirse ácido hialurónico de alto peso molecular.

[Tabla 9]

producción de ácido hialurónico según la combinación de peptonas como fuente del medio y aminoácido				
combinación de peptonas como fuente del medio y aminoácido		Conc. de ácido hialurónico (g/l)	cantidad de células microbianas (A600)	viscosidad (cP)
hidrolizado enzimático de caseína	lisina	8,314	2,611	5320
	cisteína	8,137	2,526	4450
	arginina	8,025	2,801	4340
	metionina	7,845	2,724	4110

(continuación)

producción de ácido hialurónico según la combinación de peptonas como fuente del medio y aminoácido				
combinación de peptonas como fuente del medio y aminoácido		Conc. de ácido hialurónico (g/l)	cantidad de células microbianas (A600)	viscosidad (cP)
neopeptona	lisina	7,878	2,626	3990
	cisteína	7,945	2,771	3560
	arginina	8,043	2,812	3140
	metionina	8,224	2,726	3370

<Ejemplo 9>**5 efecto de suministro semicontinuo de peptonas como fuente del medio sobre la producción de ácido hialurónico**

En la condición de combinación de hidrolizado enzimático de caseína-lisina, obtenida de los resultados de los Ejemplos previos, se determinó el efecto del hidrolizado enzimático de caseína suministrado de una manera semicontinua sobre la producción de ácido hialurónico. El tiempo de tratamiento y la concentración añadida para una concentración final del 2 % se indicaron en la tabla 9. La concentración del hidrolizado enzimático de caseína añadido finalmente se estableció fijamente como 2 %. Aquí, el grupo no tratado se añadió con un 2 % de la fuente en el estado inicial. El grupo con un tiempo de tratamiento de 8 horas y una concentración de tratamiento de 0,5 %, se añadió con un 1,5 % de hidrolizado enzimático de caseína en la etapa de cultivo inicial y se añadió adicionalmente con un 0,5 % después de 8 horas.

15 Como resultado, como se indica en la tabla 10, cuando se añadió un 1,0 % después de 24 horas, la cantidad de producción fue aproximadamente 7 g/l. Aquí, el nivel de viscosidad (6620 cP) fue mayor que el del grupo no tratado en 1500 cP. Por tanto, se descubrió que puede producirse ácido hialurónico de alto peso molecular. Sin embargo, se descubrió que la adición después de 8 horas y de 36 horas no aumentó significativamente el nivel de viscosidad, y no tuvo un efecto significativamente mayor en comparación con la condición convencional.

[Tabla 10]

producción de ácido hialurónico según lote alimentado sobre la producción de ácido hialurónico				
Tiempos de tratamiento (horas)	Conc. de tratamiento (%)	Conc. de ácido hialurónico (g/l)	cantidad de células microbianas (A600)	viscosidad (cP)
control negativo		7,465	2,365	5120
8 horas	0,5 %	7,312	2,565	5580
	1 %	7,218	2,660	5810
	1,5 %	7,881	2,149	5860
24 horas	0,5 %	7,198	2,820	6210
	1 %	7,046	2,631	6620
	1,5 %	7,249	2,648	6590
36 horas	0,5 %	8,046	3,040	5610
	1 %	8,510	3,565	5180
	1,5 %	7,915	2,951	5330

20

<Ejemplo 10>**efecto de suministro semicontinuo de glucosa sobre la producción de ácido hialurónico**

En la condición de combinación de hidrolizado enzimático de caseína-lisina, obtenida de los resultados de los Ejemplos previos, se determinó el efecto de la glucosa suministrada de una manera semicontinua sobre la producción de ácido hialurónico. El tiempo de tratamiento y la concentración añadida para una concentración final del 6 % se indicaron en la tabla 11.

- 5 Cuando se añadió un 1 % después de 24 horas, la cantidad de producción fue 9 g/l o superior. En proporción a esto, el nivel de viscosidad fue 6800 cP. Por tanto, se descubrió que puede aumentarse la producción de ácido hialurónico de alto peso molecular.

[Tabla 11]

Tiempos de tratamiento (horas)	Conc. de tratamiento (%)	Conc. de ácido hialurónico (g/l)	cantidad de células microbianas (A600)	viscosidad (cP)
control negativo		7,184	2,411	5150
24 horas	1 %	9,103	2,103	6800
	3 %	7,921	2,561	6100
	5 %	7,712	2,815	6020

10 <Ejemplo 11>

efecto semicontinuo de fuente del medio de peptonas y glucosa sobre la producción de ácido hialurónico

Usando los resultados del Ejemplo 9 y del Ejemplo 10, se suministró hidrolizado enzimático de caseína a un 1 % en un ciclo de 24 horas de una manera semicontinua hasta una concentración final del 2 %, y se suministró glucosa a un 1 % en un ciclo de 24 horas de una manera semicontinua hasta una concentración final del 6 %. Después, se determinó el efecto sobre la producción de ácido hialurónico.

Como resultado, se descubrió que se produjo ácido hialurónico en una cantidad de 9,103 g/l, y el nivel de viscosidad fue 7200 cP. A través del suministro semicontinuo de peptonas como fuente del medio y glucosa, se descubrió que puede producirse ácido hialurónico de alto peso molecular y que puede aumentarse la cantidad de producción.

<Ejemplo 12>

20 **resultado del análisis de productividad de ácido hialurónico y peso molecular promedio en cada cultivo a 75L**

Puesto que los resultados en los Ejemplos previos mostraron un alto nivel de viscosidad, a través del cultivo en un baño de fermentación de 75 l en la condición adecuada para producir ácido hialurónico de alto peso molecular, se confirmó la productividad. Después, el peso molecular se analizó por HPLC. La condición de cultivo y la composición del medio fueron las mismas que las de los Ejemplos previos.

El peso molecular promedio de ácido hialurónico se obtuvo mediante el método de cromatografía de filtración en gel (Narlin B. Beaty et al, Anal. Biochem., 1985, 147, 387-395). En el análisis, la columna fue Toyo Soda TSK gelG6000PWXL, la fase móvil comprendió NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 3 mM (pH 7,0) y NaN₂ al 0,02 %. La detección se realizó mediante un detector de índice refractivo (Shodex; Showa Denko K.K. Japón), y la sustancia patrón se preparó mediante óxido de polietileno a una concentración de 2 mg/ml por peso molecular.

Como resultado, como se indica en la tabla 12, el ácido hialurónico producido cultivado en la combinación de hidrolizado enzimático de caseína-lisina mostró un peso molecular promedio de 8.000.000 Da o superior. Especialmente, en el cultivo en la condición de suministro semicontinuo de hidrolizado enzimático de caseína (ciclo de 24 horas, 1 %) y el suministro semicontinuo de lisina y glucosa (ciclo de 24 horas, 1 %), el peso molecular fue aproximadamente 10.000.000, que fue mayor que un cultivo de medio básico (aproximadamente 5.900.000 Da) en aproximadamente 4.000.000 Da. Por tanto, se descubrió que en el método de producción de la invención, es posible producir ácido hialurónico de muy alto peso molecular. La productividad fue aproximadamente 9 g/l.

Además, se descubrió que a través del método de producción de la invención, es posible producir ácido hialurónico que tiene diversos pesos moleculares promedio de 6.000.000, 6.500.000, 7.000.000, 7.500.000, 8.000.000, 9.000.000 y 10.000.000 Da con alta productividad.

Específicamente, cuando estaba en un medio básico, la peptona de caseína se reemplazó por neopeptona, o el aminoácido se reemplazó por cisteína, se produjo ácido hialurónico que tenía un peso molecular promedio de 6.000.000 Da a 7.000.000 Da. Cuando estaba en un medio básico, la peptona de caseína se reemplazó por hidrolizado enzimático de caseína, o el aminoácido se reemplazó por lisina, se produjo ácido hialurónico que tenía

5 un peso molecular promedio de 7.000.000 Da a 8.000.000 Da. Cuando estaba en un medio básico, la peptona de caseína se reemplazó por hidrolizado enzimático de caseína, y el aminoácido se reemplazó por lisina, se produjo ácido hialurónico que tenía un peso molecular promedio de 8.000.000 Da a 9.000.000 Da. Cuando estaba en un medio básico, la peptona de caseína se reemplazó por hidrolizado enzimático de caseína, el aminoácido se reemplazó por lisina y la peptona de caseína se añadió de una manera semicontinua, se produjo ácido hialurónico que tenía un peso molecular promedio de 9.000.000 Da a 11.000.000 Da.

El medio básico, como se ha descrito en el Ejemplo 2, indica un medio que comprende glucosa, extracto de levadura, peptona de caseína, glutamina, gluconato sódico, ácido oxálico, sulfato de magnesio, fosfato potásico dibásico, cloruro sódico, acetato sódico, cloruro férrico y molibdato de amonio.

10 [Tabla 12]

resultado de análisis de productividad de ácido hialurónico y peso molecular promedio en cada cultivo			
condición de cultivo	Conc. de ácido hialurónico (g/l)	Tiempo de retención (min)	PM promedio (Da)
cepa convencional en medio básico (ID9102, Ejemplo 2)	6,851	7,200	5.197.111
cepa de la invención en medio básico (ID9103, Ejemplo 2)	7,896	7,124	5.888.482
sustitución de glutamina por lisina	8,103	6,999	7.011.421
de medio básico			
sustitución de glutamina por cisteína	8,002	7,111	6.001.441
de medio básico			
sustitución de glutamina por arginina	8,113	7,113	5.983.441
de medio básico			
sustitución de peptona de caseína por hidrolizado enzimático de caseína	8,023	6,942	7.526.023
de medio básico			
sustitución de peptona de caseína por neopeptona	7,994	7,052	6.529.651
de medio básico			
sustitución de peptona de caseína por hidrolizado enzimático de caseína y de glutamina por lisina de medio básico	8,056	6,881	8.070.838
sustitución de peptona de caseína por hidrolizado enzimático de caseína y de glutamina por lisina de medio básico,	7,526	6,753	9.220.354
el hidrolizado enzimático de caseína se añadió a un lote alimentado al 1 % durante 24 horas.			
sustitución de peptona de caseína por hidrolizado enzimático de caseína y de glutamina por lisina de medio básico,	9,203	6,850	8.346.841
la glucosa se añadió a un lote alimentado al 1 % durante 24 horas.			
sustitución de peptona de caseína por hidrolizado enzimático de caseína y de glutamina por lisina de medio básico,	9,154	6,651	10.141.891

(continuación)

resultado de análisis de productividad de ácido hialurónico y peso molecular promedio en cada cultivo			
condición de cultivo	Conc. de ácido hialurónico (g/l)	Tiempo de retención (min)	PM promedio (Da)
el hidrolizado enzimático de caseína y la glucosa se añadieron a un lote alimentado al 1 % durante 24 horas.			

<Ejemplo 13>**proceso de cultivo de 1t de *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 para producir ácido hialurónico**

- 5 Basándose en la información obtenida en los Ejemplos previos, en un baño de fermentación de 1t, se produjo ácido hialurónico. Las condiciones específicas son como se indican a continuación.

Una solución de cultivo de cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 almacenada en un refrigerador a -20 °C se cultivó en 800 ml de medio líquido esterilizado de caldo Todd-Hewitt al 3 % (pH7,8) a 37 °C durante 6 horas, y después se cultivó en 20 l de medio líquido esterilizado de caldo Todd-Hewitt al 3 % a 37 °C durante 20 horas. La solución de cultivo de siembra cultivada se mantuvo a un pH de 6,0, y la OD de la solución de cultivo medida a 600 nm fue 0,35. Esto se inoculó en 500 l de medio líquido esterilizado que tenía un 6 % (p/v) de glucosa, 2 % (p/v) de extracto de levadura, 2 % (p/v) de hidrolizado enzimático de caseína, 0,1 % (p/v) de lisina, 0,1 % (p/v) de gluconato sódico, 0,02 % (p/v) de ácido oxálico, 0,15 % (p/v) de sulfato de magnesio, 0,25 % (p/v) de fosfato potásico dibásico, 0,5 % (p/v) de cloruro sódico, 0,5 % (p/v) de acetato sódico, 0,007 % (p/v) de cloruro férrico y 0,05 % (p/v) de molibdato de amonio disueltos en el mismo, seguido de cultivo en un baño de fermentación en la condición de cultivo de 34 °C, 300 rpm, 0,5 vvm y pH 7.

Cuando el cultivo se realizó en un baño de fermentación 1t durante 48 horas, como se muestra en la FIG. 4, se obtuvo la más alta productividad (10,2 g/l) de ácido hialurónico.

Después del cultivo, se midió el peso molecular promedio de ácido hialurónico. Como resultado, debido a la condición de cultivo óptima en el lote de fermentación 1t, el peso molecular promedio fue aproximadamente 10.500.000 Da, que fue superior a 10.100.000 Da en el baño de fermentación 75L en aproximadamente 400.000 Da.

[Aplicabilidad industrial]

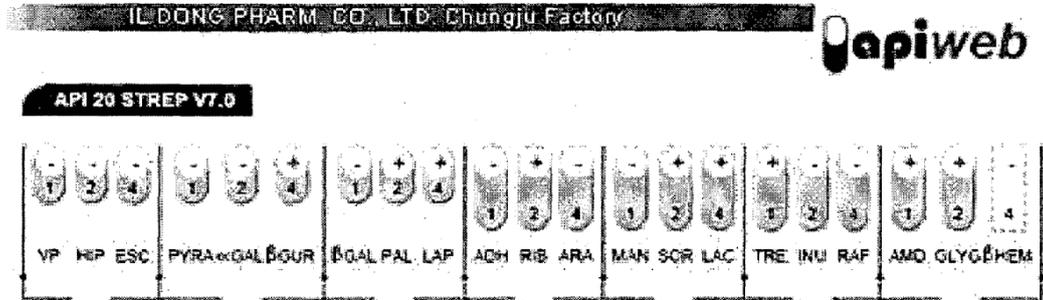
Como puede verse en lo anterior, la presente invención proporciona una cepa del género *Streptococcus* mediante la cual puede producirse con alto rendimiento ácido hialurónico de alto peso molecular, y un método de producción de ácido hialurónico usando la misma. La cepa de la invención puede producir con un alto rendimiento ácido hialurónico de peso molecular ultra alto con un alto valor añadido. En el método de la invención, de acuerdo con composiciones de un medio, es posible producir diversos ácidos hialurónicos de peso molecular ultra alto y producir ácido hialurónico de peso molecular ultra alto que tiene un peso molecular promedio de 10.000.000 Da o más hasta el máximo.

30

REIVINDICACIONES

1. Cepa *Streptococcus dysgalactiae* ID9103 que tiene un número de acceso de KCTC 11818BP.
2. Un método de producción de ácido hialurónico, que comprende la etapa de cultivar la cepa de la reivindicación 1 en un medio que comprende una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno.
- 5 3. El método de la reivindicación 2, en el que la fuente de carbono se selecciona entre el grupo que consiste en glucosa, fructosa, maltosa, lactosa, galactosa, glicerol y una mezcla de los mismos.
4. El método de la reivindicación 2, en el que la fuente de nitrógeno se selecciona entre el grupo que consiste en extracto de levadura, peptona de caseína, hidrolizado ácido de caseína, hidrolizado enzimático de caseína, bacto-peptona, casitona, neopeptona y una mezcla de los mismos.
- 10 5. El método de la reivindicación 2, en el que el medio comprende además un aminoácido.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el aminoácido se selecciona entre el grupo que consiste en glutamina, lisina, cisteína, arginina, metionina, ácido aspártico, glicina y una mezcla de los mismos.
7. El método de la reivindicación 5, en el que la fuente de nitrógeno es hidrolizado enzimático de caseína y el aminoácido es lisina.
- 15 8. El método de la reivindicación 7, en el que el hidrolizado enzimático de caseína está comprendido a una concentración de 0,5 %(p/v) a 3,0 (p/v), y la lisina está comprendida a una concentración de 0,015 %(p/v) a 0,6 (p/v).
9. El método de la reivindicación 7, en el que la fuente de carbono es glucosa.
10. El método de la reivindicación 2, en el que la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno se suministran de una manera semicontinua.
- 20 11. El método de la reivindicación 10, en el que la fuente de carbono que se suministra de una manera semicontinua es glucosa y la fuente de nitrógeno que se suministra de una manera semicontinua es hidrolizado enzimático de caseína.
12. Un método de ajuste de un peso molecular de ácido hialurónico que comprende la etapa de cultivar la cepa de la reivindicación 1 en un medio que comprende una fuente de nitrógeno seleccionada entre el grupo que consiste en neopeptona, peptona de caseína e hidrolizado enzimático de caseína, y un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en glutamina, cisteína y lisina,
- 25 en el que el peso molecular de ácido hialurónico producido mediante la etapa de cultivo se ajusta a entre 6.000.000 Da y 11.000.000 Da.
13. Un método de producción de ácido hialurónico que tiene un peso molecular promedio de 6.000.000 Da a 7.000.000 Da que comprende la etapa de cultivar la cepa de la reivindicación 1 en un medio que comprende neopeptona y glutamina, o un medio que comprende peptona de caseína y cisteína.
- 30 14. Un método de producción de ácido hialurónico que tiene un peso molecular promedio de 7.000.000 Da a 8.000.000 Da que comprende la etapa de cultivar la cepa de la reivindicación 1 en un medio que comprende hidrolizado enzimático de caseína y glutamina, o un medio que comprende peptona de caseína y lisina.
- 35 15. Un método de producción de ácido hialurónico que tiene un peso molecular promedio de 8.000.000 Da a 9.000.000 Da que comprende la etapa de cultivar la cepa de la reivindicación 1 en un medio que comprende hidrolizado enzimático de caseína y lisina.
16. Un método de producción de ácido hialurónico que tiene un peso molecular promedio de 9.000.000 Da a 11.000.000 Da que comprende la etapa de cultivar la cepa de la reivindicación 1 en un medio que comprende lisina e hidrolizado enzimático de caseína, en el que el hidrolizado enzimático de caseína se suministra de una manera
- 40 semicontinua.

【 Figura 1 】



datos del agente de ensayo Fecha
 cepa productora de AH 21.6.11
 comentarios

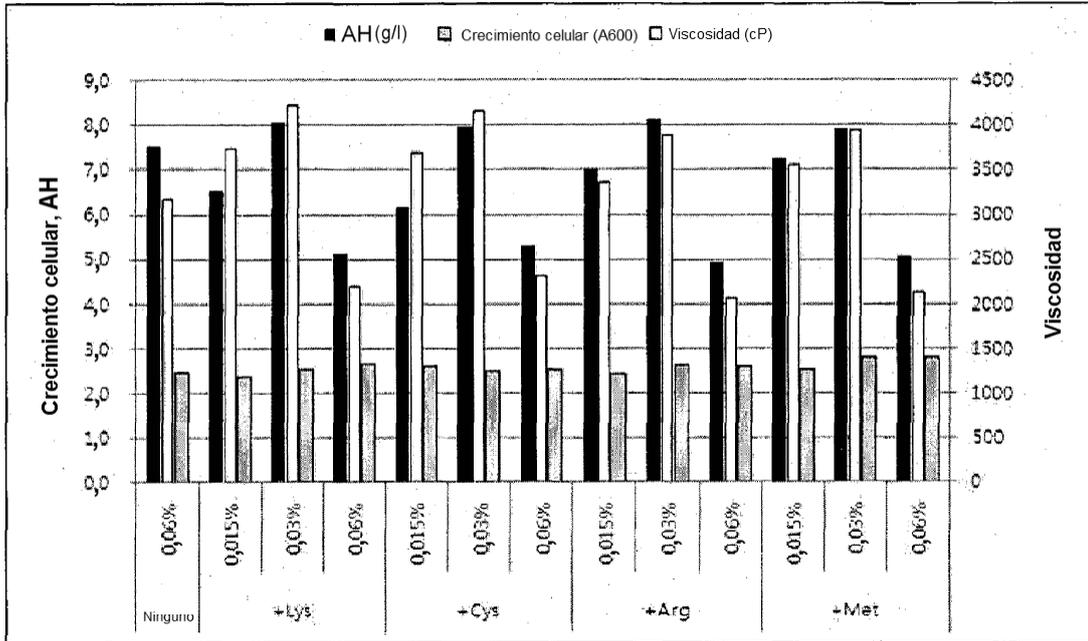
PERFIL DUDOSO

cepa	API 20 STREP V7.0
patrón bioquímico digital	0462613
comentarios	

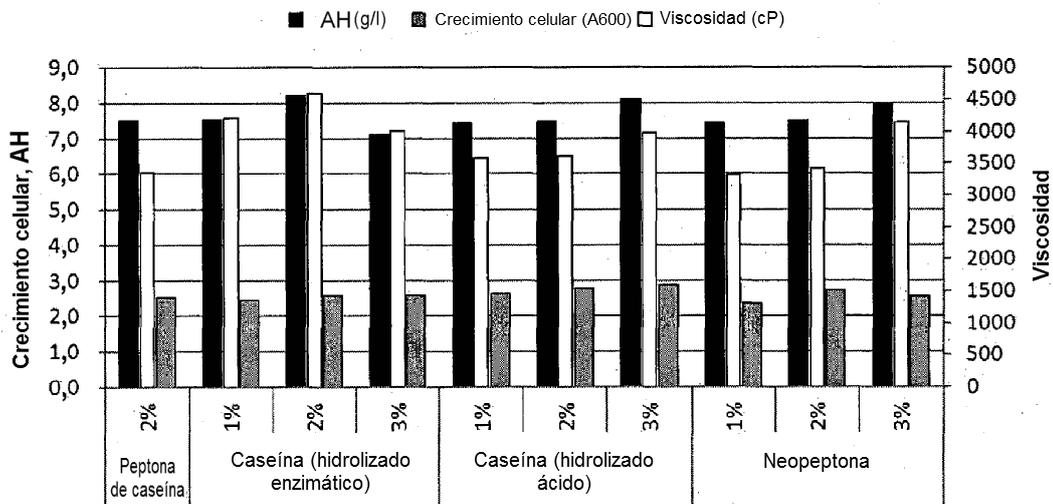
Resultado de la identificación	% ID	Indice T	Caracteres bioquímicos contrarios [ensayo en contra]
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp <i>dysgalactiae</i>	99,6	0,51	ADH 100%

2º resultado de la identificación	% ID	Indice T	Caracteres bioquímicos contrarios [ensayo en contra]
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp <i>equisimilis</i>	0,3	0,21	ADH 97% SOR 1% HEM 94%

【 Figura 2 】



【 Figura 3 】



[Figura 4]

