



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104011220 B

(45)授权公告日 2016.12.14

(21)申请号 201280048001.2  
 (22)申请日 2012.09.28  
 (65)同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 104011220 A  
 (43)申请公布日 2014.08.27  
 (30)优先权数据  
 10-2011-0100364 2011.09.30 KR  
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日  
 2014.03.28  
 (86)PCT国际申请的申请数据  
 PCT/KR2012/007955 2012.09.28  
 (87)PCT国际申请的公布数据  
 W02013/048208 EN 2013.04.04  
 (83)生物保藏信息  
 KCTC 11818BP 2010.12.02  
 (73)专利权人 日东制药株式会社  
 地址 韩国首尔  
 (72)发明人 姜大中 任种赫 金兑允 康在勋

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127  
 代理人 丁香兰 庞东成

(51)Int.Cl.  
 C12P 19/26(2006.01)  
 C12N 1/38(2006.01)  
 C12R 1/46(2006.01)

(56)对比文件  
 KR 20110029492 A,2011.03.23,  
 JP H10113197 A,1998.05.06,  
 KR 20100048778 A,2010.05.11,  
 Jong -Hyuk Im等.Optimization of  
 medium components for high-molecular-  
 weight hyaluronic acid production by  
 Streptococcus sp. ID1902 via a  
 statistical approach.《Journal of Industry  
 Microbiolgy and Biotechnology》.2009,第36  
 卷(第11期),1337-1344.

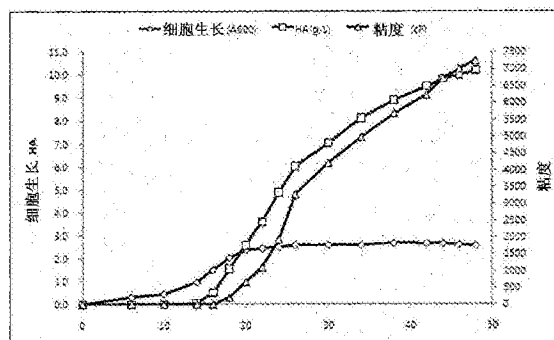
审查员 王亦秋

权利要求书2页 说明书16页 附图3页

(54)发明名称  
 停乳链球菌ID9103以及使用其的透明质酸  
 生产方法

(57)摘要

本发明涉及能以高产率生产高分子量透明质酸的链球菌属菌株和利用该链球菌属菌株的透明质酸生产方法。更详细而言,本发明涉及登录号为KCTC11818BP的停乳链球菌ID9103菌株和包含对所述菌株进行培养的步骤的透明质酸生产方法。本发明的菌株能够以高产率生产高附加值的超高分子量透明质酸,并且根据培养基的组成能够生产各种超高分子量透明质酸,以及生产最高具有10,000,000Da以上的平均分子量的超高分子量透明质酸。



1. 一种停乳链球菌ID9103菌株,其登录号为KCTC11818BP。
2. 一种透明质酸生产方法,该方法包括在包含碳源、氮源和氨基酸的培养基中对权利要求1所述的菌株进行培养的步骤,  
其中所述碳源选自葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖和甘油组成的组;  
所述氮源选自由酵母提取物、酪蛋白胨、酪蛋白酸水解物、酪蛋白酶水解物、细菌蛋白胨、酪蛋白胨和新蛋白胨组成的组;且  
所述氨基酸选自由谷氨酰胺、赖氨酸、半胱氨酸、精氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸和甘氨酸组成的组。
3. 如权利要求2所述的方法,其中,所述氮源为酪蛋白酶水解物,且所述氨基酸为赖氨酸。
4. 如权利要求3所述的方法,其中,所包含的所述酪蛋白酶水解物的浓度为0.5%(w/v)至3.0%(w/v),且所包含的所述赖氨酸的浓度为0.015%(w/v)至0.6%(w/v)。
5. 如权利要求3所述的方法,其中,所述碳源为葡萄糖。
6. 如权利要求2所述的方法,其中,以补料分批方式投入所述碳源和所述氮源。
7. 如权利要求6所述的方法,其中,以补料分批方式投入的所述碳源为葡萄糖,以补料分批方式投入的所述氮源为酪蛋白酶水解物。
8. 一种透明质酸的分子量调节方法,该方法包括在包含氮源、氨基酸和碳源的培养基中对权利要求1所述的菌株进行培养的步骤,所述氮源选自由新蛋白胨、酪蛋白胨以及酪蛋白酶水解物组成的组,所述氨基酸选自由谷氨酰胺、半胱氨酸以及赖氨酸组成的组,  
其中所述培养步骤所产生的透明质酸的分子量被调节为6,000,000Da至11,000,000Da,  
其中所述碳源选自葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖和甘油组成的组。
9. 如权利要求8所述的方法,其中通过所述培养步骤所产生的透明质酸的分子量被调节为6,000,000Da至7,000,000Da,  
其中所述培养基包含新蛋白胨、谷氨酰胺和碳源,或所述培养基包含酪蛋白胨、半胱氨酸和碳源,  
其中所述碳源选自葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖和甘油组成的组。
10. 如权利要求8所述的方法,其中通过所述培养步骤所产生的透明质酸的分子量被调节为7,000,000Da至8,000,000Da,  
其中所述培养基包含酪蛋白酶水解物、谷氨酰胺和碳源,或所述培养基包含酪蛋白胨、赖氨酸和碳源,  
其中所述碳源选自葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖和甘油组成的组。
11. 如权利要求8所述的方法,其中通过所述培养步骤所产生的透明质酸的分子量被调节为8,000,000Da至9,000,000Da,  
其中所述培养基包含酪蛋白酶水解物、赖氨酸和碳源,  
其中所述碳源选自葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖和甘油组成的组。
12. 如权利要求8所述的方法,其中通过所述培养步骤所产生的透明质酸的分子量被调节为9,000,000Da至11,000,000Da,  
其中所述培养基包含酪蛋白酶水解物、赖氨酸和碳源,其中所述酪蛋白酶水解物以补

料分批方式供给，

其中所述碳源选自葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖和甘油组成的组。

## 停乳链球菌ID9103以及使用其的透明质酸生产方法

### 技术领域

[0001] 本申请要求于2011年9月30日提交的韩国专利申请第10-2011-100364号的优先权及其权益,在此出于所有目的通过援引将其并入,这等同于在本文完全阐述。

[0002] 本发明涉及能够以高产率生产高分子量透明质酸的链球菌属菌株和利用该链球菌属菌株的透明质酸生产方法。更详细而言,本发明涉及登录号为KCTC11818BP的停乳链球菌ID9103菌株和包含对所述菌株进行培养的步骤的透明质酸生产方法。

### 背景技术

[0003] 透明质酸(HA),Hyaluronan, $(C_{14}H_{20}NNaO_{11})_n$ , $(n>1000)$ )是存在于生物体的高分子,其是称作糖胺聚糖的多糖。其具有由交替的D-葡萄糖醛酸和N-乙酰葡萄糖胺通过交替的 $\beta$ -1,3和 $\beta$ -1,4糖苷键而连结在一起的结构。透明质酸为水溶性物质,并且其可用分子量为1000~10000000Da(道尔顿)的宽范围。此外,其具有直链结构。

[0004] 具有盐结构的透明质酸体现出优异的效能效果,且由于其保湿效果强,在物理摩擦的状态下显示出强力的润滑作用。此外,透明质酸在诸如针对细菌侵入等的保护等多种效能和性质方面具有极为优良的优点。因此,近来在医学治疗领域已进行了利用透明质酸的开发。这样的优点能够适用于医学补充剂、生物材料和食品,也在医学补给和化妆品方面起着作用。此外,已持续开发了基于透明质酸的新领域。

[0005] 为了开发透明质酸,使用了生物组织提取法、微生物培养法。然而,由于鸡冠提取法会导致如病毒侵入、杂质、炎症反应等较多的缺点,因而其中分子量和生产性能得到控制且能够收获高品质的原料的微生物培养生产法近来正在成为主流。特别是最近的趋势是根据由微生物培养而调节和生产得到的透明质酸的分子量范围来决定透明质酸的用途。100,000Da以下的超低分子量透明质酸主要用于食品和化妆品的用途,平均分子量为1,000,000Da的低分子量透明质酸用于开发滴眼液的原料或衍生物,平均分子量为3,000,000~4,000,000Da的透明质酸在用作膝关节注射剂原料时具有较高的价值。

[0006] 当然,对于更高分子量范围的透明质酸的极为多样的应用还有很大余地。据预期,其作为膝关节治疗剂以及作为眼科手术佐剂的应用能得到极大地增加。此外,由于体内的许多区域需要超高分子量透明质酸的作用,超高分子量透明质酸可以充分替代传统透明质酸连接材料,后者是通过增加相对低分子量的透明质酸的分子量、粘度或者弹性而得到的。

[0007] 可以发现,大多数在韩国申请的主要专利都局限于高分子量透明质酸的发明。韩国注册专利第KR10-0250573号(LG)披露了3,500,000Da的透明质酸的生产,韩国注册专利KR10-0472007(Vacctech,kolon)披露了生产平均分子量为5,500,000Da的透明质酸的技术。在国外大部分(US4784990、JP2058502和EP144019)具有生产4,000,000Da以下的透明质酸的技术。特别是在US6090596的情况中,虽然能生产高分子量的透明质酸,但现实是因极低的生产性和生产方法实际上难以在工业上利用该技术,也无法确保经济效率。

[0008] 众所周知,一般而言,广泛开发得到的3,000,000Da~4,000,000Da的高分子量的透明质酸在应用于需要高粘度/弹性的医疗领域中时,在效能/效果方面存在许多不足。为

了解决这样的缺点,需要发明一种技术,从而能够经济有效地生产6,000,000Da以上的超高分子量的透明质酸。此外,为了恰当地开发作为具有高附加价值的工业药物的超高分子量透明质酸,应该以最具有创造性的方法来将上述技术发展为具有竞争力和经济效率的技术。

[0009] 因此,为了解决上述缺点,需要通过应用具有创造性和经济有效性的微生物培养基组成和大规模生产技术来开发一种能够以高生产性生产高分子量的透明质酸的方法。

## 发明内容

[0010] 技术问题

[0011] 因此,本发明人研究了高效地生产高分子量透明质酸的方法,并锁定停乳链球菌ID9103,所述停乳链球菌ID9103是没有透明质酸裂解酶的非溶血性突变株。通过确立了它的最佳培养条件,本发明人完成了本发明。

[0012] 因此,本发明的一个目的在于提供登录号为KCTC11818BP的停乳链球菌ID9103菌株。

[0013] 本发明的另一个目的在于提供一种透明质酸生产方法,该方法包括在包含碳源以及氮源的培养基中对上述菌株进行培养的步骤。

[0014] 本发明的再一个目的在于提供一种透明质酸的分子量调节方法,该方法包含在含有至少一种氮源和至少一种氨基酸的培养基中对链球菌属微生物进行培养的步骤,所述至少一种氮源选自由新蛋白胨、酪蛋白胨以及酪蛋白酶水解物(casein enzymatic hydrolysate)组成的组,所述至少一种氨基酸选自由谷氨酰胺、半胱氨酸以及赖氨酸组成的组。

[0015] 技术方案

[0016] 为了达成上述目的,本发明提供登录号为KCTC11818BP的停乳链球菌ID9103菌株。

[0017] 为了达成另一个上述目的,本发明提供一种透明质酸生产方法,该方法包括在含有碳源以及氮源的培养基中对上述菌株进行培养的步骤。

[0018] 为了达成另一个上述目的,本发明提供一种透明质酸的分子量调节方法,该方法包括在含有至少一种氮源和至少一种氨基酸的培养基中对链球菌属微生物进行培养的步骤,所述至少一种氮源选自由新蛋白胨、酪蛋白胨以及酪蛋白酶水解物组成的组,所述至少一种氨基酸选自由谷氨酰胺、半胱氨酸以及赖氨酸组成的组。

[0019] 以下对本发明进行详细说明。

[0020] 本发明提供登录号为KCTC11818BP的停乳链球菌ID9103菌株。

[0021] 本发明的停乳链球菌ID9103菌株的特征在于,其为非溶血性,不表达透明质酸酶。进一步,本发明的停乳链球菌ID9103菌株的特征在于,其能够以优异的生产效率生产高分子量透明质酸。

[0022] 本发明的停乳链球菌ID9103菌株为一种新型微生物,其是通过下述方法得到的:在从牛的粪便分离出的微生物中,分离出产透明质酸菌株,在这些菌株中引起突变并选取出产生透明质酸裂解酶的非溶血性菌株。

[0023] 上述本发明的停乳链球菌ID9103菌株基于伯杰氏手册(Bergey's manual)的鉴定实验被鉴定为链球菌属的微生物,然后通过利用Api20链球菌试剂盒的鉴定确认为链球菌

属的停乳菌种(*dysgalactiae*)。因此,将其命名为停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)ID9103,并在2010年12月2日将其保藏于韩国典型培养物保藏中心([www.kctc.re.kr](http://www.kctc.re.kr))(登录号:KCTC-11818BP)。

[0024] 此外,本发明提供一种透明质酸生产方法,该方法包括在含有碳源以及氮源的培养基中对本发明的停乳链球菌ID9103进行培养的步骤。

[0025] 本发明的停乳链球菌ID9103菌株能够利用通常的链球菌属微生物的培养法而培养得到。培养基包含碳源以及氮源,也可再包含氨基酸。

[0026] 本发明的培养方法没有特别限定。例如,可以使用分批式培养、补料分批式(*fed-batch*)培养、连续式培养。本发明中,可以优选使用补料分批式培养方法。在所述补料分批式培养中,提供至补料批次的培养基可以包含氮源,或者氮源和碳源。更优选的是,所述氮源为酪蛋白酶水解物,而所述碳源为葡萄糖。

[0027] 碳源没有限制,只要是公知的能在微生物培养中使用的碳源就可以。优选地,其可选自由葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖、甘油以及它们混合物组成的组。更优选地,碳源为葡萄糖。

[0028] 氮源没有限制,只要是公知的能在微生物培养中使用的氮源就可以。优选地,其可选自由酵母提取物、酪蛋白胨、酪蛋白胨水解物、酪蛋白酶水解物、细菌蛋白胨、酪蛋白胨、新蛋白胨(*neopeptone*)以及它们的混合物组成的组。更优选地,氮源为酵母提取物和酪蛋白酶水解物的混合物。

[0029] 酪蛋白酶水解物通过酪蛋白的酶促分解而获得。例如,其可以是胰蛋白胨、胰蛋白胨T、胰蛋白胨X、BBL Biosate蛋白胨、DIPCO酪蛋白消化物、细菌酪蛋白胨、BBL胰化酪蛋白胨(*trypticasepeptone*)、细菌胰蛋白胨、BITEC胰蛋白胨、NZ胺A、NZ胺AS、NZ胺EKC、NZ胺L浓缩物、NZ酶(NZ case)、NZ酶M、NZ酶ME、NZ酶+、NZ酶TT、肽酶、胰蛋白胨USP、药典级胰腺消化酪蛋白(*pancreatic digest casein codex*)、胰腺消化酪蛋白、酶水解的酪蛋白洁食(*enzymatic hydrolyzed casein kosher*)或胰蛋白胨V。

[0030] 酪蛋白胨水解物可以是酪蛋白胨水解物、BBL酸水解酶蛋白胨(*acidicase peptone*)、细菌酪蛋白胨氨基酸(*bacto-casamino acid*)、工艺级细菌酪蛋白胨氨基酸、Amicase、Hicase Amino、hiKM、HicaseSF或酸分解的酪蛋白。

[0031] 产物,本发明的培养基进一步可含有氨基酸。所追加的氨基酸的种类没有限制。优选地,其可选自由谷氨酰胺、赖氨酸、半胱氨酸、精氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸、甘氨酸以及它们的混合物组成的组,且更优选可为赖氨酸。

[0032] 更优选的是,本发明的培养基组合物可以包含作为氮源的酪蛋白酶水解物以及作为氨基酸的赖氨酸。在包含酪蛋白酶水解物和赖氨酸的培养基中培养本发明菌株时,该菌株所生产的透明质酸的量增加,并且生产出具有极高平均分子量的透明质酸。

[0033] 在酪蛋白酶水解物和赖氨酸的浓度方面没有特别限制。优选地,以0.5%(w/v)至3.0%(w/v)的浓度含有酪蛋白酶水解物,以0.015%(w/v)至0.6%(w/v)的浓度含有赖氨酸。

[0034] 本发明的停乳链球菌ID9103菌株能够用于以9g/L以上的高产率生产具有10,000,000Da以上的平均分子量的超高分子量透明质酸。

[0035] 同时,本发明提供一种透明质酸的分子量调节方法,其包含在含有氮源和氨基酸

的培养基中对链球菌属微生物进行培养的步骤,所述氮源选自由新蛋白胨、酪蛋白胨以及酪蛋白酶水解物组成的组,所述氨基酸选自由谷氨酰胺、半胱氨酸以及赖氨酸组成的组。

[0036] 所述链球菌属微生物没有限制,只要其可生产透明质酸且属于链球菌属即可。其优选为停乳链球菌菌株,更优选为停乳链球菌ID9103(登录号:KCTC11818BP)菌株。

[0037] 所述分子量是指透明质酸平均分子量,所述调节是指通过改变氮源和氨基酸的种类来生产具有特定的分子量范围的透明质酸。所述透明质酸的分子量范围没有特别限定。优选地,分子量可以为6,000,000Da至7,000,000Da、7,000,000Da至8,000,000Da、8,000,000Da至9,000,000Da、或者9,000,000Da至11,000,000Da。

[0038] 此外,根据本发明的生产方法,利用本发明的停乳链球菌ID9103菌株,根据需要能够以高产率生产得到具有6,000,000Da以上的各种平均分子量的超高分子量透明质酸。

[0039] 具体而言,在含有新蛋白胨和谷氨酰胺的培养基或包含酪蛋白胨和半胱氨酸的培养基中对本发明的菌株进行培养时,可以生产得到具有6,000,000Da至7,000,000Da的平均分子量的透明质酸。

[0040] 在含有酪蛋白酶水解物和谷氨酰胺的培养基或包含酪蛋白胨和赖氨酸的培养基中培养本发明的菌株时,可以生产得到具有7,000,000Da至8,000,000Da的平均分子量的透明质酸。

[0041] 在含有酪蛋白酶水解物和赖氨酸的培养基中培养本发明的菌株时,可以生产得到具有8,000,000Da至9,000,000Da的平均分子量的透明质酸。

[0042] 在含有酪蛋白酶水解物和赖氨酸的培养基中利用以补料分批方式供给酪蛋白酶水解物的方法来培养本发明的菌株时,可以生产得到具有9,000,000Da至11,000,000Da的平均分子量的透明质酸。

[0043] 本发明所述的平均分子量是指重均分子量。

[0044] 本发明的效果通过本发明的实施例得到呈现。

[0045] 在本发明的实施例中,对于从全国10个饲养场采集的约500个试样,将其涂抹于3.7%脑心浸液固体培养基,并对生成了粘性物质的菌落进行分离。用显微镜选取具有链结构的球菌然后利用革兰氏染色法选取革兰氏阳性菌。对选取的菌株进行培养,利用唑法和浊度分析来分离出生产透明质酸的菌株。通过在分离出的菌株中引起突变,分离出不表达透明质酸酶的非溶血性菌株。结果,确认本发明的停乳链球菌ID9103菌株不表达透明质酸分解酶、未体现出溶血性,且透明质酸生产能力优异。其后,通过鉴定,将其鉴定为链球菌属的停乳菌种,并在2010年12月2日将其保藏于韩国典型培养物保藏中心(KCTC),登录号为KCTC11818BP。

[0046] 在本发明的一实施例中,在同一条件下对常规停乳链球菌和本发明的菌株进行培养,然后对透明质酸的生产率和粘度进行了测定。结果发现,与常规菌株相比,本发明的菌株显示出高出20%以上的透明质酸生产能力,且显示出远高于常规菌株的粘度。因此,确定了本发明的菌株是一种可有效生产高分子量透明质酸的菌株。

[0047] 在本发明的另一实施例中,确立了能够提高本发明的停乳链球菌ID9103菌株的透明质酸生产能力的培养条件。根据酵母提取物的浓度、氨基酸的种类和浓度以及氮源的种类和浓度,对透明质酸生产能力和培养液的粘度进行测定,从而选取显示出优异生产能力且能够生产高分子量透明质酸的培养基组合物。通过利用上述条件的组合进行的培养试

验,确立了最佳培养条件。具体而言,发现在组合物中所含的酵母提取物的浓度为0.75%以上时,透明质酸的生产增加,且透明质酸的平均分子量增加。发现在使用赖氨酸、半胱氨酸、精氨酸或甲硫氨酸时,生产出高分子量透明质酸,此外还发现当使用酪蛋白酸水解物、酪蛋白酶水解物或新肽菌素(neopeptin)作为氮源时,生产出高分子量透明质酸。

[0048] 在本发明的另一实施例中发现,当通过上文所获的多种培养条件的组合对停乳链球菌ID9103菌株进行培养时,能够生产得到具有6,000,000Da、7,000,000Da或8,000,000Da的分子量的多种高分子量透明质酸。由此发现,通过本发明的菌株和本发明的培养方法,能够高效率地生产所需的各种高分子量透明质酸。

[0049] 此外,在本发明的另一实施例中,当在包含酪蛋白酶水解物和赖氨酸的培养基组成中培养所述菌株时,透明质酸的生产量增加,并且生产得到的透明质酸的平均分子量显著提高。因此,测试了合适的浓度。结果,发现当所含的酪蛋白酶水解物的浓度为0.5%(w/v)至3%(w/v)且所含的赖氨酸浓度为0.015%(w/v)至0.6%(w/v)时,能够高效地生产得到具有8,000,000Da以上的平均分子量的透明质酸。

[0050] 在本发明的另一实施例中,发现当在补料分批式培养方法中利用补料分批方式供给酪蛋白酶水解物和基本培养基组合物(葡萄糖)时,以9.0g/L以上的极高效率生产得到具有1,000,000Da以上的平均分子量的超高分子量透明质酸。

[0051] 有利效果

[0052] 本发明提供能够以高产率生产高分子量透明质酸的链球菌属菌株以及利用该菌株的透明质酸生产方法。本发明的菌株能够以高产率生产附加价值高的超高分子量透明质酸。在本发明的生产方法中,根据不同的培养基的组成能够生产多种超高分子量透明质酸,以及生产最高具有1,000,000Da以上的平均分子量的超高分子量透明质酸。

## 附图说明

[0053] 图1为由Api试剂盒鉴定的本发明的停乳链球菌ID9103菌株的鉴定结果。

[0054] 图2是示出根据所添加的氨基酸的种类和浓度所生产得到的透明质酸的量、培养液的粘度和微生物细胞的量的图表。

[0055] 图3是示出根据所添加的蛋白胨的种类和浓度所生产得到的透明质酸的量、培养液的粘度和微生物细胞的量的图表。

[0056] 图4是示出当在1t发酵浴中于包含酪蛋白酶水解物和赖氨酸的培养基中对本发明的停乳链球菌ID9103菌株进行培养时,随着生产时间推移的透明质酸的生产量、培养液的粘度和微生物细胞的量的图表。

## 具体实施方式

[0057] 以下将参考附图对本发明的优选实施方式进行说明。在以下说明和附图中,相同的参考数字用于指示相同或相似的成分,因此可以省略对相同或相似成分的重复描述。

[0058] 实施例1

[0059] 停乳链球菌ID9103的选取

[0060] 1-1.生产透明质酸的链球菌属菌株的锁定

[0061] 生产透明质酸(HA)的链球菌属在脑心浸液(Brain heart infusion)培养基(小牛



脑髓浸液0.77%、牛心浸液0.98%、示蛋白胨(proteose peptone)1%、右旋葡萄糖0.2%、NaCl0.5%、磷酸二钠0.25%；BD,美国)中得到良好生长,并且在单一菌落分离物中,其能生产透明质酸,由此形成比普通菌落更光滑且具有粘性的菌落。

[0062] 将从全国10个饲养场采集的约500个试样以使得每个固体培养基能生长约200个菌落的方式进行稀释,然后涂抹于3.7%脑心浸液固体培养基上。然后,通过肉眼将发现生成了粘性物质的菌落挑选出来。

[0063] 为了从形态学的角度观察确认分离出的菌株,将其涂抹于脑心浸液固体培养基从而使菌落分离,并在37℃的培养基中进行培养。当形成菌落时,在载玻片上滴加一滴无菌蒸馏水。然后,将一个菌落置于消过毒的牙签的前端,并使其溶于蒸馏水。将样品以盖玻片覆盖,并通过显微镜放大观察微生物细胞( $\times 400$ ),选取链球菌属那样具有链结构的球菌。

[0064] 为了选取革兰氏阳性链球菌属,通过革兰氏染色法利用上述方法在载玻片上准备试样,在灯上稍微加热从而使菌附着于载玻片。利用染料染色约1分钟后,利用缓流水洗去染料。在将水干燥至一定程度后,向其中滴加1滴矿物油。将样品用盖玻片进行覆盖,并用显微镜进行观察。此处,着色为紫色的为经染色的革兰氏阳性菌。利用该方法选取了适合的菌株备选物。

[0065] 为了确认各菌株所生产的粘性物质是否为HA,对HA生产进行了确认。为确认HA生产,利用了呋唑反应和十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)反应。呋唑反应为以硫酸对HA进行分解并对所得到的葡萄糖醛酸的量进行测定的方法。基于呋唑反应确认HA生产后,进行CTAB反应以确认HA生产。CTAB对粘膜进行破坏使其不透明。HA为粘性物质,因此通过CTAB的破坏而得到不溶复合物,从而变得不透明。呋唑反应的缺点在于,因为由其它糖产生的葡萄糖醛酸也被测定,因此在培养液状态下会测定到比实际量更高的HA量。由于CTAB仅与HA反应,能够简单地以短时间确认HA生产。通过呋唑反应来选取生产包括HA在内的多糖的菌株,并通过CTAB反应从这些菌株中来选取生产HA的菌株。

[0066] 呋唑反应是能够定量糖醛酸的方法。构成透明质酸的物质之一为葡萄糖醛酸,因此会因反应而被着色成紫色,由此能够进行定量。呋唑反应中,将1ml试样加入5ml的0.025M的四硼酸钠十水合物( $H_2SO_4$ 溶液)中,充分混合,在水中煮沸10分钟。在冰上冷却后,向其添加200 $\mu$ l的0.1%呋唑(EtOH溶液)并混合,并在水中煮沸10分钟。在525nm对吸光度进行测定。

[0067] CTAB反应中,用0.03%的SDS溶液将稀释为1/10的培养液进一步稀释至其一半浓度。然后,将200 $\mu$ l所得溶液与200 $\mu$ l乙酸缓冲液(乙酸钠1.55%、乙酸0.063%、NaCl0.88%)混合,并在37℃进行30分钟反应。向其中添加800 $\mu$ l CTAB溶液。在600nm对吸光度进行测定。

[0068] 1-2. 没有透明质酸酶活性的非溶血性突变株的锁定

[0069] 将在实施例1-1中选出的生产透明质酸的菌株在50ml的3.7%脑心浸液液体培养基中在37℃振荡培养24小时。对OD(600nm)为0.3的培养液进行N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG)处理,随后在37℃搅拌1小时,从而确定死亡率95%的条件。以4000rpm的转速对利用10mg/ml的NTG进行了处理的培养液进行离心,收集微生物细胞,并用50mM的Tris-马来酸盐缓冲液(pH8.0)进行3次清洗。如此,利用无菌生理盐水将其中诱发了突变的孢子稀释为 $10^2$ /ml~ $10^4$ /ml的浓度,然后将其涂抹于含有5%绵羊血的脑心浸液固体培养基,并在37℃进行培养。然后,选取不具有由红血球受到破坏所致的清晰区域的非溶血性菌落。但是,由

于有可能再次出现溶血性,针对所述非溶血性菌落反复进行NTG突变。然后,选取在次代培养物中未显示出溶血性的菌落。

[0070] 从锁定的非溶血性菌株中,通过实施例1-1所述的CTAB反应来选取不表达透明质酸酶的菌落。将锁定的非溶血性菌株在添加了0.1%透明质酸的脑心浸液固体培养基中培养1天,并向其上层追加10%CTAB。从不具有透明质酸酶活性的菌落中,选取周边没有清晰区域的停乳链球菌ID9103。

[0071] 1-3.所选菌株的鉴定

[0072] 为了基于伯杰氏手册中的生化特性来将菌株鉴定为链球菌属,在鉴定试验中,在包含酵母提取物和蛋白胨的基本培养基中加入了确定生化特性所需的糖和氨基酸,观察颜色的变化。向培养基添加的来源为菊粉、乳糖、甘露醇、棉子糖、核糖、水杨苷、山梨糖醇、海藻糖、精氨酸、七叶甙和马尿酸盐。此处,向其中加入溴甲酚紫(BCP),并观察菌株与未经接种的对照物之间的颜色变化。BCP在中性pH时着色为紫色,在酸性pH时为黄色,在碱性pH时为红色。在接种微生物细胞之前,培养基为中性,并着色为紫色。

[0073] 结果,基于伯杰氏手册,本发明的停乳链球菌ID9103菌株显示出与链球菌属的停乳菌种极其相似的特性。该结果如表1所示。

[0074] 表1

[0075] 生化特性

[0076]

	菊粉	乳糖	甘露醇	棉子糖	核糖	海藻糖	精氨酸	七叶甙	马尿酸盐
对照组	-	+	-	-	+	+	-	-	-
实验组	-	+	-	-	+	+	+	-	-

[0077] 利用Api试剂盒鉴定了在实施例1-2中选取的停乳链球菌ID9103菌株。通过使用Api20链球菌试剂盒(Biomereieux,法国)对链球菌的鉴定,根据制造公司的手册进行了鉴定。在固体培养基上,利用棉棒使菌株充分溶于2ml悬浮培养基,从而制备具有4McFarland浊度的接种液。链球菌依次包含包括VP、HIP、ESC、PYRA、aGAL、BGUR、BGAL、PAL、LAP、ADH、RIB、ARA、MAN、SOR、LAC、TRE、RAF、AMD、GLYG在内的共20个杯状凹(cupule),并且它们分别导致不同的反应。从VP至LA,分别对每一种杯状凹添加100 $\mu$ l接种液;对于其余的杯状凹,添加100 $\mu$ l的接种液(其以每500 $\mu$ l量混有2ml GP培养基)。ADH和GLYG中添加矿物油。培养4小时后,向VP滴加VP1和VP2各1滴;在HIP中滴加2滴NIN试剂;从PYRA至LAP,对每一种分别滴加1滴ZYM A和ZYM B试剂。10分钟后测定结果,在24小时后,对其它杯状凹再次读取结果。

[0078] 结果如图1所示,本发明的停乳链球菌ID9103被鉴定为链球菌属的停乳菌种。

[0079] 停乳链球菌ID9103在2010年12月2日保藏于韩国典型培养物保藏中心(KCTC),登录号为KCTC11818BP。

[0080] 实施例2

[0081] 对于高分子量透明质酸生产的基本培养条件试验和生产量比较试验

[0082] 2-1.基本培养条件试验

[0083] 对保管于-72 $^{\circ}$ C的冰箱中的停乳链球菌ID9103菌株培养液4ml进行急速解冻,涂布于5.2%脑心浸液固体培养基,并在37 $^{\circ}$ C培养24小时。切出面积为1cm<sup>2</sup>的生长的菌落,并将其接种于40ml的3% Todd-Hewitt肉汤无菌液体培养基(心脏浸液0.31%、新蛋白胨2%、右旋葡萄糖0.2%、NaCl0.2%、磷酸二钠0.04%、碳酸钠0.25%;BD,美国)。

[0084] 将40ml在37℃以120rpm经振荡培养的液体用作原代种子培养液。在培养6小时后的对数生长期,将原代种液无菌接种于3份3% Todd-Hewitt肉汤无菌液体培养基(40ml, pH7.8)。在培养条件为37℃和120rpm的情况下无菌培养20小时以上后,将培养基用作次代种子培养液。此处,次代种子培养液必须维持为 $6.4 \pm 0.2$ 的pH,且OD(600nm)必须为 $0.35 \pm 0.05$ 。将120ml次代种子培养液接种于主培养基,随后进行40小时以上的培养。根据发酵浴叶轮的转速、培养温度、培养基组成,观察了透明质酸在生产力方面的差异。然后,确定用于提高透明质酸生产力的条件。以上的培养工序在全部实施例中以相同方式进行。

[0085] 为了确定透明质酸的最佳生产条件,在5L发酵浴中,在3.5L的培养液的条件进行了主培养基确定试验。培养基组合物包括葡萄糖6%(w/v)、酵母提取物0.5%(w/v)、酪蛋白胨2%(w/v)、谷氨酰胺0.06%(w/v)、葡萄糖酸钠0.1%(w/v)、草酸0.02%(w/v)、硫酸镁0.15%(w/v)、磷酸氢二钾0.25%(w/v)、氯化钠0.5%(w/v)、乙酸钠0.5%(w/v)、氯化铁0.007%(w/v)和钼酸铵0.05%(w/v)。测试基本在pH7.0和34℃的条件下进行。

[0086] 本发明中,培养液中的透明质酸浓度利用卟啉法(T. Bitter, Anal. Biochem., 1962, 4, 330-334)和浊度分析(S. Jung-Min, Carbohydr. Polym., 2009, 78, 633-634)来进行双重确认。

[0087] 粘度分析使用LVDV-1(Brookfield, 美国)来进行,其中,在S31号纺锤体、RPM3.0、试样温度为25℃的条件下对试料进行分析,从而测定得到粘度(cP)。

[0088] 微生物细胞量如下进行测定:将200 $\mu$ l的稀释为合适浓度(培养液的1/10)的培养液转移至96孔微孔板,并在600nm波长使用多检测微孔板阅读器(BioTek, 美国)对吸光度进行测定。

[0089] 发酵浴叶轮的转速非常重要,因为该叶轮起到通过使氧气和营养成分能够与培养基均匀地混合从而帮助微生物细胞生长的作用。当将转速设定为100rpm至500rpm时, ID9103的培养结果如表2所示。

[0090] 在各叶轮转速,透明质酸的生成量和微生物细胞量类似,但粘度升高。因此发现,低的叶轮转速有助于提高分子量。因此,在以下的实施例的试验中,统一将发酵浴的叶轮的转速固定为100rpm。

[0091] 表2

[0092] 根据叶轮的转速的透明质酸浓度

[0093]

叶轮转速(rpm)	透明质酸浓度(g/L)	微生物细胞量(A600)	粘度(cP)
100	7.468	2.540	2860
300	7.452	2.765	1210
500	7.431	2.687	870

[0094] 2-2. 对于透明质酸生产量的比较试验

[0095] 在相同条件下对常规停乳链球菌菌株和本发明的停乳链球菌ID9103菌株进行培养,由此来比较透明质酸生产量。

[0096] 培养基组成和培养条件与实施例2-1相同,叶轮转速设定为100rpm。

[0097] 结果如表3所示,发现与现有的菌株相比,本发明的菌株在同一条件显示出高20%以上的更高的透明质酸的生产量。尤其是,发现本发明的菌株显示出远高于常规菌株的粘

度。因此,确定了本发明的菌株为能有效地生产高分子量透明质酸的菌株。

[0098] 表3

[0099] 与常规链球菌相比的透明质酸浓度

[0100]

菌株	透明质酸浓度(g/L)	微生物细胞量(A600)	粘度(cP)
ID9102	6.039	3.710	1680
ID9103	7.311	2.881	2580

[0101] 实施例3

[0102] 基于酵母提取物的浓度的调节的高分子量透明质酸生产性

[0103] 基于实施例2中确定的培养条件和培养基组成,变化酵母提取物的浓度来进行培养。已知氮源在微生物的代谢中发挥重要的作用,对透明质酸的生产也会产生影响。因此,确定了对作为氮源的酵母提取物的浓度的调节对透明质酸的生产性也会有帮助。

[0104] 结果如表4所示,与0.5%(w/v)的酵母提取物相比,在2%(w/v)的酵母提取物时粘度增加。因此,确认到酵母提取物的浓度的提高适于生产高分子量透明质酸。在以下的实施例的试验中,将酵母提取物的浓度提高至至多2%(w/v)。

[0105] 表4

[0106] 根据酵母提取物浓度的透明质酸浓度

[0107]

酵母提取物浓度(%(w/v))	透明质酸浓度(g/L)	微生物细胞量(A600)	粘度(cP)
0.5	7.490	2.365	2620
2	7.896	2.565	3370
3.5	7.782	2.820	3050

[0108] 实施例4

[0109] 氨基酸对透明质酸生产的影响

[0110] 基于前述实施例中确定的培养条件和培养基组成,验证了各种氨基酸对高分子量透明质酸的生产有何种影响。本实施例所使用的氨基酸如表5所示。将常规谷氨酰胺替换为表5的氨基酸。

[0111] 结果如表5所示,使用赖氨酸、半胱氨酸或精氨酸的组产生的透明质酸的量为8g/L以上;而包含赖氨酸、半胱氨酸、精氨酸或甲硫氨酸的其它组显示出比对照组更高的粘度。尤其是,包含赖氨酸的组,显示出比对照组高得多的粘度(4230cP)。

[0112] 表5

[0113] 根据氨基酸的透明质酸生产

[0114]

氨基酸	透明质酸浓度(g/L)	微生物细胞量(A600)	粘度(cP)
谷氨酰胺	7.501	2.472	3170
赖氨酸	8.111	2.511	4230
半胱氨酸	8.034	2.503	4160
精氨酸	8.211	2.626	3890
甲硫氨酸	7.992	2.803	3940

天冬氨酸	7.861	2.721	2790
甘氨酸	7.792	2.398	2980

[0115] 实施例5

[0116] 氨基酸的浓度对透明质酸生产的影响

[0117] 为了确认在实施例4中显示出高粘度的赖氨酸、半胱氨酸、精氨酸和甲硫氨酸的适当培养基浓度,以不同浓度添加每种氨基酸,随后进行培养后。然后,对透明质酸的浓度、微生物细胞量和培养液的粘度等进行测定。

[0118] 结果如表6和图2所示,4种氨基酸在浓度为0.03%(w/v)时显示出比其它浓度时更高的粘度。赖氨酸和半胱氨酸显示出比其它浓度时更高的粘度水平(分别为4230cP和4160cP)。精氨酸和甲硫氨酸显示出比常规条件时更高的粘度水平(分别为3890cP和3940cP),但该粘度水平未达4000cP。在该浓度条件下,透明质酸的生产量约为8g/L,这比在其它浓度时更高。

[0119] 在以下实施例的试验中,将氨基酸浓度固定设为0.03%(w/v)。

[0120] 表6

[0121] 根据氨基酸浓度的透明质酸生产

氨基酸 / 浓度	透明质酸浓度 (g/L)	微生物细胞量 (A600)	粘度 (cP)
谷氨酰胺	0.06% 7.542	2.472	3170
赖氨酸	0.015% 6.521	2.345	3740
	0.03% 8.070	2.511	4230
	0.06% 5.140	2.667	2200
半胱氨酸	0.015% 6.153	2.578	3690
	0.03% 7.956	2.503	4160
	0.06% 5.315	2.541	2310
精氨酸	0.015% 7.032	2.410	3360
	0.03% 8.120	2.626	3890
	0.06% 4.952	2.578	2060
甲硫氨酸	0.015% 7.254	2.521	3560
	0.03% 7.934	2.803	3940
	0.06% 5.060	2.784	2120

[0122] 实施例6

[0123] 蛋白胨(作为培养基源)对透明质酸生产的影响

[0124] 基于实施例3中确定的培养条件和培养基组成,针对将用作氮源的常规酪蛋白胨替换为作为培养基源的其它蛋白胨是否能够生产高分子量透明质酸进行确认。本实施例所使用的蛋白胨示于表7,浓度为1%(w/v)。

[0125] 结果如表7所示,与酪蛋白胨相比,酪蛋白胨水解物、酪蛋白酶水解物和新蛋白胨显示出更高的粘度水平。尤其是,酪蛋白酶水解物显示出4590cP的粘度水平,可正面预期其可产生高分子量透明质酸。

[0126] 表7

[0127] 根据作为培养基源的蛋白胨的透明质酸生产

[0128]

作为培养基源的蛋白胨	透明质酸浓度(g/L)	微生物细胞量(A600)	粘度(cP)
------------	-------------	--------------	--------

酪蛋白胨	7.506	2.520	3350
酪蛋白酸水解物	7.481	2.774	3610
酪蛋白酶水解物	8.210	2.564	4590
细菌蛋白胨	7.614	2.865	3050
酪胨	7.210	3.048	3140
新蛋白胨	7.513	2.716	3420

[0130] 实施例7

[0131] 蛋白胨(作为培养基源)的浓度对透明质酸生产的影响

[0132] 为了确认实施例6中显示出高粘度的酪蛋白酸水解物、酪蛋白酶水解物和新蛋白胨的适当培养基浓度,以各种浓度添加每种氮源,然后进行培养。然后,对透明质酸的浓度、微生物细胞量和培养液的粘度等进行测定。

[0133] 结果如表8和图3所示,酪蛋白酶水解物在1%(w/v)显示出最高粘度,而酪蛋白酸水解物和新蛋白胨在1.5%(w/v)显示出最高粘度。酪蛋白酶水解物和新蛋白胨分别显示出8.2g/L和8.0g/L的高生产量,并分别显示出4590cP和4140cP的高粘度。酪蛋白酸水解物显示出8.1g/L的高生产量,但仅显示出3980cP的粘度水平(小于4000cP)。在以下的实施例的实验中,基于该结果,将酪蛋白酶水解物的浓度固定设为1%(w/v),将酪蛋白酸水解物和新蛋白胨的浓度固定设为1.5%(w/v)。

[0134] 表8

[0135]

作为培养基源的蛋白胨 / 浓度	透明质酸浓度 (g/L)	微生物细胞量 (A600)	粘度 (cP)
酪蛋白胨	2% 7.506	2.520	3350
酪蛋白酶水解物	1% 7.523	2.463	4210
	2% 8.210	2.564	4590
	3% 7.103	2.573	4010
酸水解酪素	1% 7.435	2.626	3580
	2% 7.481	2.774	3610
	3% 8.102	2.874	3980
新蛋白胨	1% 7.438	2.346	3310
	2% 7.513	2.716	3420
	3% 7.982	2.557	4140

[0136] 实施例8

[0137] 基于蛋白胨和氨基酸的组的透明质酸生产性的比较

[0138] 利用实施例4和实施例5中确定的氨基酸与在实施例6和实施例7中确定的蛋白胨的组合,确认对透明质酸生产的影响。如表9所示,在包含蛋白胨和氨基酸的组的培养基组合物中,对本发明的停乳链球菌ID9103进行培养来生产透明质酸。

[0139] 结果,蛋白胨培养基源和氨基酸的各个组合显示出约为8g/L的透明质酸浓度。同时,在粘度方面,与酪蛋白酶水解物的组合显示出了更高的水平。尤其是酪蛋白酶水解物-赖氨酸组合显示出了8.3g/L的高透明质酸浓度和更高的粘度水平(5320cP),该粘度比实施例7的酪蛋白酶水解物(4590cP)高出730cP。因此,确认能够生产高分子量透明质酸。

[0140] 表9

[0141] 根据作为培养基源的蛋白胨和氨基酸的组的透明质酸生产

作为培养基源的蛋白胨和氨基酸的组合		透明质酸浓度 (g/L)	微生物细胞量 (A600)	粘度 (cP)
[0142]	酪蛋白酶水解物-赖氨酸	8.314	2.611	5320
	半胱氨酸	8.137	2.526	4450
	精氨酸	8.025	2.801	4340
[0143]	新蛋白胨-甲硫氨酸	7.845	2.724	4110
	赖氨酸	7.878	2.626	3990
	半胱氨酸	7.945	2.771	3560
	精氨酸	8.043	2.812	3140
	甲硫氨酸	8.224	2.726	3370

[0144] 实施例9

[0145] 作为培养基源的蛋白胨的分批补料对透明质酸生产的影响

[0146] 在获自前述实施例的结果的酪蛋白酶水解物-赖氨酸组合的条件下,确定了以补料分批方式供给的酪蛋白酶水解物对透明质酸生产的影响。处理时间和为了使最终浓度为2%而追加的浓度示于表9。将最终的酪蛋白酶水解物的添加浓度固定设为2%。此处,未处理组在初始状态添加了2%的所述培养基源。处理时间为8小时且处理浓度为0.5%的组在初始培养期加入1.5%的酪蛋白酶水解物,然后在8小时后追加0.5%。

[0147] 结果如表10所示,在24小时追加1.0%时,生产量为约7g/L。此处,粘度水平(6620cP)比未处理组高出1500cP。因此,发现能够生产高分子量透明质酸。然而,发现在8小时和36小时后进行的追加并未显著提高粘度水平,因此与常规条件相比并不具有显著更高的效果。

[0148] 表10

[0149] 根据对透明质酸生产的分批补料的透明质酸生产

[0150]

处理时间 (小时)	处理浓度 (%)	透明质酸浓度 (g/L)	微生物细胞量 (A600)	粘度 (cP)
阴性对照		7.465	2.365	5120
8小时处理	0.5%	7.312	2.565	5580
	1%	7.218	2.660	5810
	1.5%	7.881	2.149	5860
24小时处理	0.5%	7.198	2.820	6210
	1%	7.046	2.631	6620
	1.5%	7.249	2.648	6590
36小时处理	0.5%	8.046	3.040	5610
	1%	8.510	3.565	5180
	1.5%	7.915	2.951	5330

[0151] 实施例10

[0152] 葡萄糖的分批补料对透明质酸生产的影响

[0153] 在获自前述实施例的结果的酪蛋白酶水解物-赖氨酸组合的条件下,确定了以补料分批方式供给的葡萄糖对透明质酸生产的影响。处理时间和为了使最终浓度为6%而追加的浓度示于表11。

[0154] 在24小时后添加1%时,生产量为9g/L。与此成比例的是,粘度水平为6800cP。

[0155] 由此发现高分子量透明质酸的生产能得到提高。

[0156] 表11

[0157]

处理时间(小时)	处理浓度 (%)	透明质酸浓度 (g/L)	微生物细胞量 (A600)	粘度 (cP)
阴性对照		7.184	2.411	5150
24小时处理	1%	9.103	2.103	6800
	3%	7.921	2.561	6100
	5%	7.712	2.815	6020

[0158] 实施例11

[0159] 蛋白胨培养基源和葡萄糖的分批补料对透明质酸生产的影响

[0160] 利用实施例9和实施例10中的结果,在24小时循环中以补料分批方式以1%供给酪蛋白酶水解物而使最终浓度为2%,在24小时循环中以补料分批方式以1%供给葡萄糖而使最终浓度为6%。然而确认对透明质酸生产的影响。

[0161] 结果发现,生产的透明质酸的量为9.103g/L,且粘度水平为7200cP。通过蛋白胨培养基源和葡萄糖的分批补料供给,发现能够生产高分子量透明质酸生产且生产量能得到提高。

[0162] 实施例12

[0163] 在75L的各培养物中的透明质酸生产性和平均分子量的分析结果

[0164] 由于前述实施例中的结果显示出高粘度水平,在适于生产高分子量透明质酸的条件于75L发酵浴中进行培养,确认了生产性。然后,利用HPLC对分子量进行分析。培养条件和培养基组成与前述实施例中那些相同。

[0165] 透明质酸的平均分子量是通过凝胶过滤色谱法(Narlin B. Beaty等, Anal. Biochem., 1985, 147, 387-395)获得。在分析中,色谱柱为Toyo Soda TSK gelG6000PWXL,流动相包含150mM NaCl、3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH7.0)和0.02%NaN<sub>2</sub>。检测通过折射率检测器(Shodex; Showa Denko K.K., 日本)进行,且标准物质通过将聚氧乙烯制备为单位分子量2mg/ml的浓度来制备。

[0166] 结果示于表12,通过在酪蛋白酶水解物-赖氨酸组合中培养而生产得到的透明质酸显示出8,000,000Da以上的平均分子量。尤其是,在酪蛋白酶水解物分批补料(24小时循环,1%)以及赖氨酸和葡萄糖分批补料(24小时循环,1%)的条件下进行培养时,分子量为约10,000,000Da,其比基础培养基培养物(约5,900,000Da)高出约4,000,000Da。由此,发现在本发明的生产方法中,能够生产极高分子量的透明质酸。生产性为约9g/L。

[0167] 除此之外,发现通过本发明的生产方法,能够以高生产性生产具有6,000,000Da、650万Da、7,000,000Da、750万Da、8,000,000Da、9,000,000Da、10,000,000Da等各种平均分子量的透明质酸。

[0168] 具体而言,在基础培养基中,将酪蛋白胨替换为新蛋白胨、或将氨基酸替换为半胱氨酸时,可以生产具有6,000,000Da至7,000,000Da的平均分子量的透明质酸。在基础培养基中,将酪蛋白胨替换为酪蛋白酶水解物、或将氨基酸替换为赖氨酸时,可以生产具有7,000,000Da至8,000,000Da的平均分子量的透明质酸。在基础培养基中,将酪蛋白胨替换为



酪蛋白酶水解物并且将氨基酸替换为赖氨酸时,可以生产具有8,000,000Da至9,000,000Da的平均分子量的透明质酸。在基础培养基中,将酪蛋白胨替换为酪蛋白酶水解物、将氨基酸替换为赖氨酸并进一步以补料分批方式追加所述酪蛋白胨时,可以生产具有9,000,000Da至11,000,000Da的平均分子量的透明质酸。

[0169] 如实施例2所述,所述基础培养基是指包含葡萄糖、酵母提取物、酪蛋白胨、谷氨酰胺、葡萄糖酸钠、草酸、硫酸镁、磷酸二氢钾、氯化钠、乙酸钠、氯化铁和钼酸铵的培养基。

[0170] 表12

[0171] 各培养物中的透明质酸生产性和平均分子量的分析结果

[0172]

培养条件	透明质酸浓度 (g/L)	保持时间 (分钟)	平均分子量 (Da)
基础培养基中的常规菌株(ID9102、实施例2)	6.851	7.200	5,197,111
基础培养基中的本发明菌株(ID9103、实施例2)	7.896	7.124	5,888,482
将基础培养基的谷氨酰胺替换为赖氨酸	8.103	6.999	7,011,421
将基础培养基的谷氨酰胺替换为半胱氨酸	8.002	7.111	6,001,441
将基础培养基的谷氨酰胺替换为精氨酸	8.113	7.113	5,983,441
将基础培养基的酪蛋白胨替换为酪蛋白酶水解物	8.023	6.942	7,526,023
将基础培养基的酪蛋白胨替换为新蛋白胨	7.994	7.052	6,529,651
将基础培养基的酪蛋白胨替换为酪蛋白酶水解物并将谷氨酰胺替换为赖氨酸	8.056	6.881	8,070,838
将基础培养基的酪蛋白胨替换为酪蛋白酶水解物、将谷氨酰胺替换为赖氨酸并将酪蛋白酶水解物在24小时以1%分批补料进行添加	7.526	6.753	9,220,354

[0173]

将基础培养基的酪蛋白胨替换为酪蛋白酶水解物、将谷氨酰胺替换为赖氨酸并将葡萄糖在24小时以1%分批补料进行添加	9.203	6.850	8,346,841
将基础培养基的酪蛋白胨替换为酪蛋白酶水解物、将谷氨酰胺替换为赖氨酸并将酪蛋白酶水解物和葡萄糖在24小时以1%分批补料进行添加	9.154	6.651	10,141,891

[0174] 实施例13

[0175] 停乳链球菌ID9103的用于透明质酸生产的1t培养工序

[0176] 基于在前述实施例中获得的信息,在1t发酵浴中进行透明质酸的生产。具体条件如下所述。

[0177] 将于-20℃的冰箱中保管的停乳链球菌ID9103菌株培养液在800ml3% Todd-Hewitt肉汤无菌液体培养基(pH7.8)中在37℃培养6小时,然后将其在20L3% Todd-Hewitt肉汤无菌液体培养基中以37℃培养20小时。将培养后的种子培养液维持为6.0的pH,且在

600nm测定的培养液的OD为0.35。将其接种于500L的其中溶解有6% (w/v) 葡萄糖、2% (w/v) 酵母提取物、2% (w/v) 酪蛋白酶水解物、0.1% (w/v) 赖氨酸、0.1% (w/v) 葡萄糖酸钠、0.02% (w/v) 草酸、0.15% (w/v) 硫酸镁、0.25 (w/v) 的磷酸氢二钾、0.5% (w/v) 氯化钠、0.5% (w/v) 乙酸钠、0.007% (w/v) 氯化铁和0.05% (w/v) 钼酸铵的无菌液体培养基中,随后在发酵浴中在34℃、300rpm、0.5vvm和pH7的培养条件下进行培养。

[0178] 在1t发酵浴中进行48小时培养后,如图4所示,获得了最高的透明质酸生产性(10.2g/L)。

[0179] 培养后,对透明质酸平均分子量进行测定。结果,由于在1t发酵浴中的最佳培养条件,平均分子量为约10,500,000Da,其比在75L发酵浴中的10,100,000Da高出约400,000Da。

[0180] 工业实用性

[0181] 如上所述,本发明提供能够以高产率生产高分子量透明质酸的链球菌属菌株以及利用其的透明质酸生产方法。本发明的菌株能够以高产率生产附加价值高的超高分子量透明质酸。在本发明的生产方法中,根据培养基组成,能够生产各种超高分子量透明质酸,且能够生产最高具有10,000,000Da以上的平均分子量的超高分子量透明质酸。

[0182] 根据国际承认用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约

[0183] 关于对科学描述和/或提议分类名称的在后标示或修改的认证

[0184] (根据第8.2条作出)

[0185] 接收方:李荣吉

[0186] 日东制药株式会社

[0187] 60, Yangjae-dong, Seocho-gu, 首尔137-733

[0188] 韩国

[0189]

所附通信已于2010年12月10日由该国际保藏机构收到。

KCTC 11818BP

链球菌物种 ID9103 : 停乳链球菌 ID9103

国际保藏机构

名称: 韩国典型培养物保藏中心  
地址: 韩国生物科学与生物技术研究所  
(KRIBB)  
111 Gwahangno, 儒城区  
大田市 305-806  
韩国

有权代表国际保藏机构的人员或获授权  
官员的签名:



LEE, Jung-Seok, 主管

日期: 2011年7月14日

[0190] 附件:根据第8.1条对科学描述和/或提议分类名称的在后标示或修改的通信

[0191] 根据国际承认用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约

[0192] 国际表格

[0193] 关于原始保藏的收据

[0194] (根据第7.1条作出)

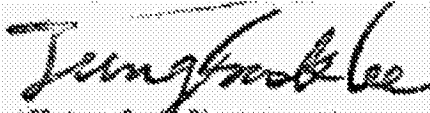
[0195] 接收方:李荣吉

[0196] 日东制药株式会社

[0197] 60, Yangjae-dong, Seocho-gu, 首尔137-733

[0198] 韩国

[0199]

<b>I. 微生物身份认证</b>	
保藏人给出的身份认证参考： 链球菌物种 ID9103	国际保藏机构给出的登录号： KCTC 11818BP
<b>II. 科学描述和/或提议分类名称</b>	
上述第 I 项所指认的微生物附有： [x] 科学描述 [ ] 提议分类名称 (在适用处打叉标记)	
<b>III. 接收与认可</b>	
该国际保藏机构认可其于 2010 年 12 月 2 日接收到的上述第 I 项所指认的微生物。	
<b>IV. 接收或转换请求</b>	
上述第 I 项所指认的微生物已于 由该国际保藏机构接收， 并且该国际保藏机构于 接收到将原始保藏转换为基于布达佩斯条约的保藏的请求。	
<b>V. 国际保藏机构</b>	
名称：韩国典型培养物保藏中心 地址：韩国生物科学与生物技术研究所 (KRIBB) 111 Gwahangno, 儒城区 大田市 305-806 韩国	有权代表国际保藏机构的人员或获授权 官员的签名：  LEE, Jung-Seok, Director LEE, Jung-Seok, 主管 日期：2010 年 12 月 10 日



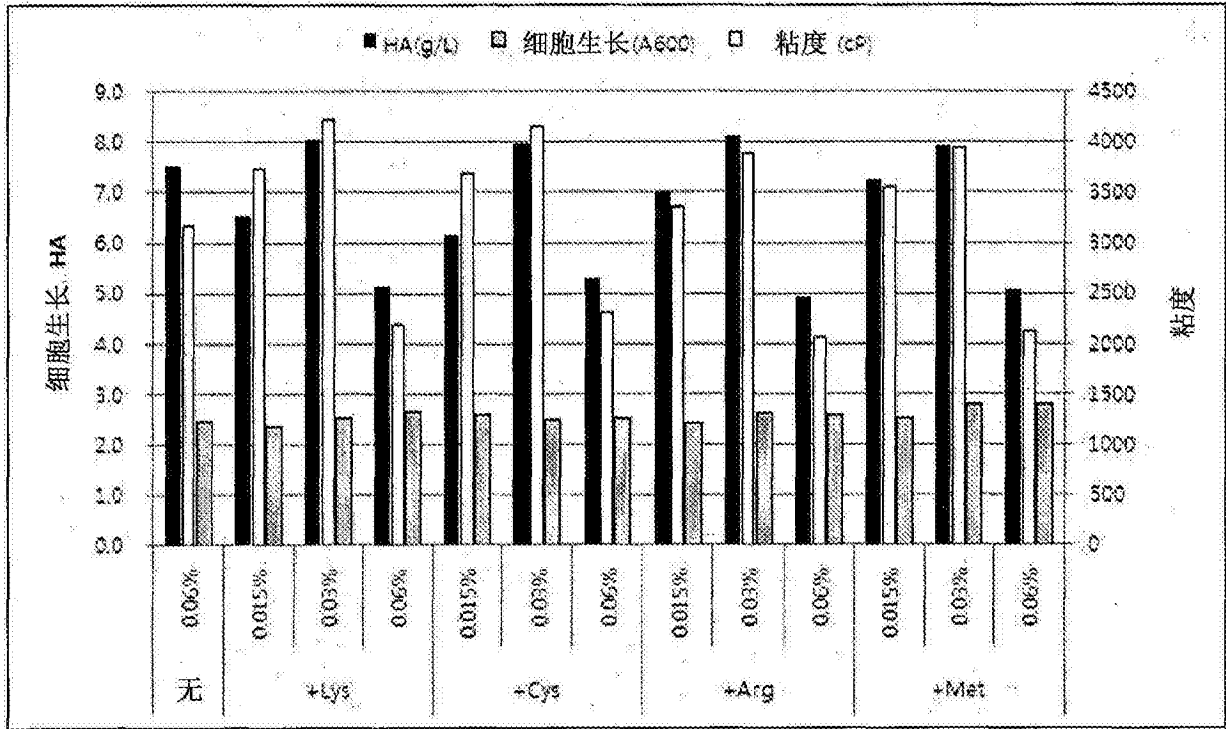


图2

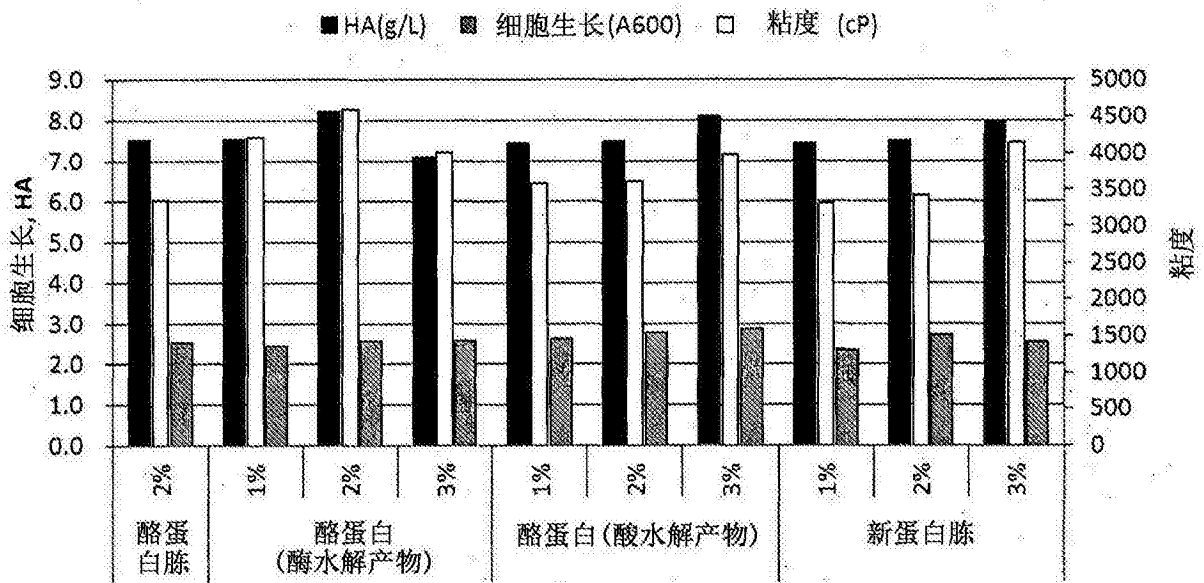


图3

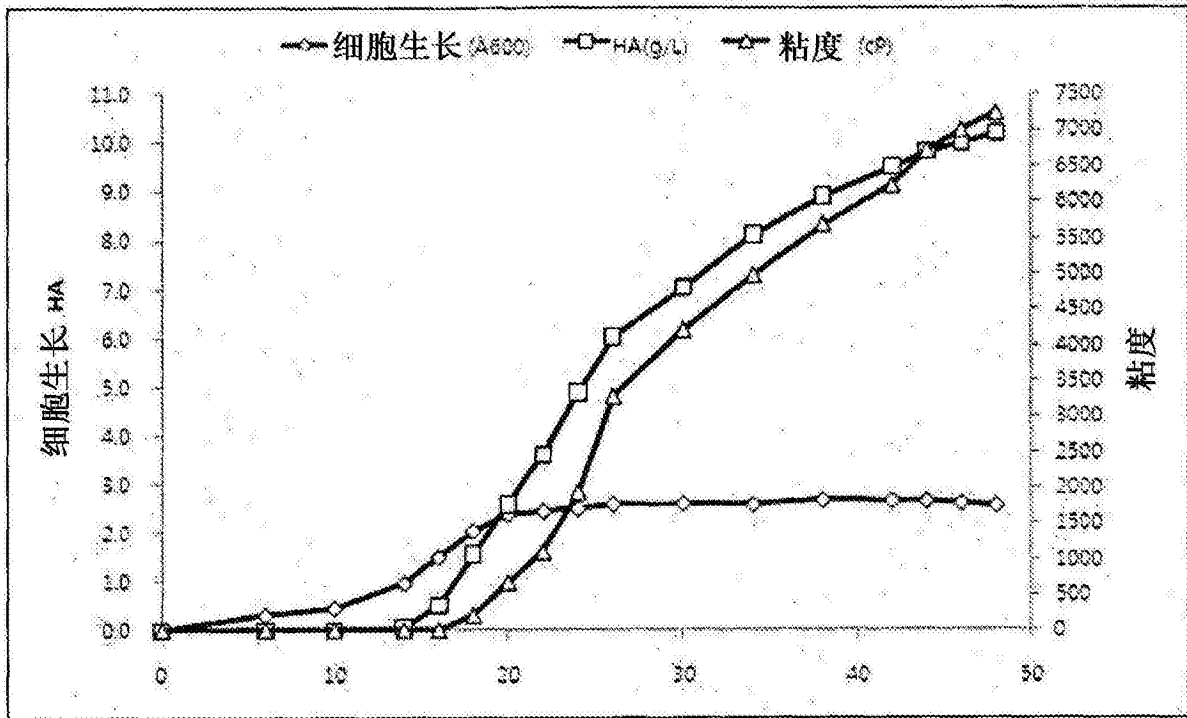


图4